

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

SILENÇAGE DU GÈNE MDR1 ET RESENSIBILISATION DES CELLULES MCF-7 MDR À
LA DOXORUBICINE EN UTILISANT LES NANOPARTICULES CHITOSANE/MDR1-
siARN

MOHAMAD EL-ARISS

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

AVRIL 2016

© Mohamad El-Ariss, 2016.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

SILENÇAGE DU GÈNE MDR1 ET RESENSIBILISATION DES CELLULES MCF-7 MDR À
LA DOXORUBICINE EN UTILISANT LES NANOPARTICULES CHITOSANE/MDR1-
siARN

présenté par: EL-ARISS Mohamad

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. SAWAN Mohamad, Ph. D., président

M. MERZOUKI Abderrazzak, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. SAVARD Pierre, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. LE TIEN Canh, Ph. D., membre

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à

mon père Abdul-Kader El-Ariss

&

ma mère Al-Amira Rim Chehab El-Ariss.

Sans vous, ce mémoire n'aurait jamais eu lieu.

REMERCIEMENTS

Ce fut un très long chemin parcouru, plein de hauts et de bas, plein de "dos d'ânes" et de "nids de poule", mais qui mène à une magnifique destination pleine d'espoirs. Plein parmi nous décident de faire un demi-tour pour changer de chemin et en essayer un autre; et plein, en essayant de chercher la meilleure route, finissent par se perdre. Je pense que ce sont les personnes qui nous accompagnent pendant notre voyage qui font toute la différence. Sans mes parents, mon frère, ma sœur et ma fiancée, j'aurai longtemps décidé de changer de chemin. Ils étaient toujours à mes côtés, me soutenaient et me poussaient constamment pour finir mon parcours, même quand je n'avais plus de souffle. Et c'est pour cette raison que je vous dis, merci ! Vous étiez toujours, êtes et seraient à jamais ma source d'inspiration, ma force et la raison de ma réussite.

Cette maîtrise fut une extraordinaire expérience qui restera gravée dans ma tête et sera, à jamais, une excellente histoire à raconter. Elle a contribué à faire de moi l'homme dont je suis aujourd'hui, et a surtout développé en moi des compétences indispensables pour réussir n'importe quel travail.

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Dr. Abderrazzak Merzouki et mon codirecteur Dr. Pierre Savard de m'avoir accueilli parmi leur équipe de recherche. J'aimerais encore une fois remercier Dr. Merzouki qui a cru en moi tout au long de ma maîtrise. Sa patience était toujours appréciée, et sa confiance en moi est à la base de la réussite de ce projet. Je ne peux pas assez remercier Dre Myriam Jean pour son soutien ainsi que ses commentaires et corrections précieux menant au produit final de ce mémoire. Un remerciement spécial à mes amis et collègues Mohamed Benhammadi et Rabeb Mouna Derbali pour leur soutien moral et professionnel.

RÉSUMÉ

Le cancer est la principale cause de décès au Canada et il est à l'origine d'environ 30 % de tous les décès au pays.[1] On estime qu'en 2015, un Canadien sur quatre (24 % de femmes et 29 % d'hommes) mourra d'un cancer. Dans le monde et uniquement pour l'année 2012, on rapporte 14 millions de nouveaux cas de cancer et 8,2 millions de décès causés par cette maladie.[2] Le pire est à venir, car, selon l'Organisation mondiale de la santé, le nombre de nouveaux cas devrait augmenter d'environ 70% au cours des deux prochaines décennies. La forte mortalité associée au cancer s'explique en partie par l'acquisition d'une résistance aux médicaments qui rend les patients réfractaires à la chimiothérapie. En effet, les cellules cancéreuses soumises à un agent cytotoxique lors de la chimiothérapie risquent de développer une résistance à cet agent ainsi qu'aux divers agents partageant des ressemblances structurales et/ou fonctionnelles. Il s'agit de cellules cancéreuses ayant une résistance multiple aux drogues (MDR "Multiple Drug resistant cells"). Le développement d'une résistance aux chimiodrogues est un problème majeur de santé publique et représente un obstacle pour le développement de nouveaux traitements anticancéreux. Les MCF-7 MDR sont des lignées établies de cellules humaines de cancer du sein qui ont développé une résistance aux chimiodrogues telle que la doxorubicine. Les MCF-7 MDR ont la particularité de surexprimer la protéine P-gp qui est responsable de la désintoxication des cellules par reflux des chimiodrogues.

Le but de cette étude consistait donc à réduire l'expression de la protéine P-gp, codée par le gène MDR1 (aussi appelé gène ABCB1), dans des cellules cancéreuses MCF-7 MDR et ainsi resensibiliser ces dernières aux traitements anti-cancer. Afin d'interférer dans l'expression du gène MDR1, nous avons utilisé de petits ARN interférents, appelés siARN, complémentaires à des séquences spécifiques au niveau du gène MDR1 humain. Au total, quatre duplexes de siARN ont été utilisés pour cette étude: siARN_1, siARN_1M, siARN_2 et siARN_2M. Chacun des brins des duplexes est formé au total de 21 acides nucléiques et possède deux acides nucléiques dépassants "overhangs" à l'extrémité 3'. Les siARN_1 et siARN_1M sont complémentaires à la séquence d'acides nucléiques (577-595 acides nucléiques) du gène MDR1 alors que les siARN_2 et siARN_2M sont complémentaires à une séquence légèrement décalée en aval sur le même gène (583-607 acides nucléiques). Les duplexes

ARN_1 et ARN_2 sont formés d'ADN au niveau des extrémités dépassantes alors que les duplexes ARN_1M et ARN_2M sont formés exclusivement d'ARN. Les duplexes siARN_1 et siARN_2 proviennent des travaux publiés par Hao Wu et al. (2003), Stege et al. (2004) et Milette-Gonzalez et al. (2005). Ces derniers démontrent que ces séquences de siARN sont efficaces pour silencer le gène MDR1 dans le cas des cellules cancéreuses (du sein : MCF-7/AdrR et MCF-7/BC-19 et de l'estomac : EPG85-257RDB).[3-5] De plus, Strapps et al. (2010) ont montré que l'utilisation de siARN possédant un brin guide avec des extrémités dépassantes formées de ribonucléotides mène à un silençage *in vivo et in vitro* semblable mais avec une meilleure longévité comparativement à l'utilisation de siARN aux extrémités dépassantes formées de déoxyribonucléotides.[6] Ainsi les séquences siARN_1M et siARN_2M correspondent aux séquences siARN_1 et siARN_2 mais dont les extrémités dépassantes sont formées de ribonucléotides.

Ces siARN dirigés spécifiquement contre le gène MDR1 (MDR1-siARN) ont été combinés au chitosane afin de former des nanoparticules pouvant protéger ces MDR1-siARN et les livrer dans les cellules MCF-7 MDR. Le chitosane, servant ici de système de livraison, est un polysaccharide naturel et biodégradable dont les propriétés biologiques sont définies par sa masse molaire moyenne (Mn) et par son degré de désacétylation (DDA). Lorsque le chitosane chargé positivement est mis en présence de siARN chargé négativement, il y a formation de nanoparticules par attraction électrostatique. Dans ce projet, le chitosane 92-10 (DDA-Mn) a été utilisé comme système de livraison avec un ratio N:P (ratio amine de chitosane : phosphate d'ARN) de 5.

Les analyses par diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont démontré que les nanoparticules ont un diamètre variant entre 62,56 et 82,72 nm et un potentiel zêta variant de 17,4 à 23,5 mV. Des analyses en microscopie confocale ont prouvé que les nanoparticules chitosane 92-10-5/siARN marquées sont internalisées dans les cellules MCF-7 MDR et que les siARN sont libérés dans le cytoplasme. Les cellules MCF-7 MDR, résistantes aux drogues, ont été transfectées, *in vitro*, avec les différentes nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. La quantification par qPCR a démontré que la transfection des cellules MCF-7 MDR entraîne une inhibition de l'expression du gène MDR1 de 71%. De plus, des tests de cytotoxicité ont démontré que l'utilisation des nanoparticules permet une resensibilisation des cellules à la doxorubicine. En effet, le taux de mortalité des cellules MCF-7 MDR exposées à

la doxorubicine, a augmenté jusqu'à 60% en transfectant préalablement les cellules avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ MDR1-siARN. En conclusion, nous avons mis au point des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ MDR1-siRNA qui réduisent l'expression du gène MDR1 codant pour la P-gp dans les cellules MCF-7 MDR et permettent de resensibiliser ces dernières à la doxorubicine. Cette étude démontre le potentiel des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ MDR1-siRNA pour le traitement des cancers résistants à la chimiothérapie.

ABSTRACT

Cancer is the leading cause of death in Canada and is responsible for about 30% of all deaths in the country.[1] It is estimated that by 2015, one in four Canadians (24% women and 29% men) will die from cancer. In the world and only for 2012, 14 million new cancer cases and 8.2 million deaths from the disease were reported.[2] The worst is yet to come because, according to World Health Organization, the number of new cases is expected to increase by about 70% over the next two decades. The high mortality associated with cancer is partly explained by the acquisition of drug resistance that make patients refractory to chemotherapy. In fact, cancer cells exposed to a cytotoxic agent during chemotherapy, may develop a resistance to this agent as well as various agents sharing structural or functional similarities. These cancer cells are known for multidrug resistance ("Multiple Drug resistant cells"). The development of resistance to chemodrogues is a major public health problem that presents an obstacle for the development of new cancer treatments. MCF-7 MDR are established cell lines of human breast cancer that have developed resistance to chemodrogues such as doxorubicin. MCF-7 MDR have the particularity to over-express P-gp protein that is responsible for the detoxification of cells by reflux of chemodrogues. The purpose of this study was therefore to reduce the expression of P-gp, encoded by the MDR1 gene (also called gene ABCB1) in cancer cells MCF-7, and re-sensitize MCF-7 MDR cells to anti-cancer treatments. In order to modify MDR1 gene expression, we used small RNAi called siRNA that are specific to the MDR1 gene. In total, 4 duplexes of siRNA have been used: siRNA_1, siRNA_1M, siRNA_2 and siRNA_2M. Each of the duplexes strands consists of 21 nucleic acids and has two protruding nucleic acids (overhangs) at the 3' end. siRNA_1 and siRNA_1M are complementary to the nucleic acid sequence (577-595 nucleic acids) of the MDR1 gene, whereas siRNA_2 and siRNA_2M are complementary to a sequence shifted slightly downstream in the same gene (583-607 nucleic acids). RNA duplexes siRNA_1 and siRNA_2 consist exclusively of DNA while "modified" siRNA_1M and siRNA_2M consist of RNA overhangs. siRNA duplexes (siRNA_1 and siRNA_2) were chosen from the work published by Hao Wu et al. (2003), Stege et al. (2004) and Miletto-Gonzalez et al. (2005) which showed that these siRNA sequences are effective to silence MDR1 gene in cancer cells (breast cancer cells MCF-7 / AdrR and MCF-7 / BC-19 and stomach cancer cells: EPG85-257RDB).[3-5] Moreover, Strapps et al. (2010) showed that the use of siRNA having

overhangs formed of ribonucleotides leads to a similar silencing but lasting longer *in vivo* and *in vitro* compared to the use of siRNA containing deoxyribonucleotides overhangs.[6] Thus siARN_1M and siARN_2M sequences correspond to siARN_1 and siARN_2 sequences but whose overhangs are formed of ribonucleotides.

These siRNA specific to the MDR1 gene (MDR1-siRNA) were combined to chitosan to form nanoparticles capable of protecting these MDR1-siRNA and delivering it into the MCF-7 MDR cells. Chitosan used here as a delivery system, is a natural and biodegradable polysaccharide whose biological properties are defined by its average molecular weight (MW) and by its degree of deacetylation (DD). When the positively charged chitosan is added with the negatively charged siRNA, there is formation of nanoparticles by electrostatic attraction. In this project, chitosan 92-10 (DDA- MW) was used as a delivery system with a N:P (ratio chitosan amino groups: RNA phosphate) of 5.

Analysis by dynamic light scattering (DLS) demonstrated that the nanoparticles have a diameter between 62.56 and 82.72 nm and a zeta potential ranging from 17.4 to 23.5 mV. Analysis by confocal microscopy showed that chitosan (92-10-5)/labeled siRNA are internalized in MCF-7 MDR cells and that siRNAs are released in the cytoplasm. MCF-7 cells resistant MDR were transfected *in vitro* with different chitosan nanoparticles 92-10/MDR1-siRNA. qPCR quantification showed that transfection of MCF-7 MDR cells leads to inhibition of the expression of the MDR1 gene by 71%. In addition, induced cytotoxicity tests showed that the use of nanoparticles allows resensitizing cells to doxorubicin. In fact, the mortality rate of MDR MCF-7 cells exposed to doxorubicin increased to 60% after transfecting the cells with the nanoparticles chitosane (92-10-5)/ MDR1-siRNA. In conclusion, we have developed Chitosan (92-10-5)/ MDR1-siRNA nanoparticles that reduce the expression of P-gp in cells and allow the latter to re-sensitize to Doxorubicin. This study demonstrated the potential of chitosan nanoparticles (92-10-5)/ MDR1-siRNA for the treatment of cancers resistant to chemotherapy.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VIII
TABLE DES MATIÈRES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES	XVI
LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS	XVIII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
Hypothèse et Objectifs du projet.....	5
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	7
2.1 Le Cancer	7
2.1.1 Définition	7
2.1.2 Cancers somatiques et héréditaires	7
2.1.3 Causes.....	8
2.1.4 Diagnostique.....	14
2.1.5 Métastases et effets systémiques	15
2.1.6 Prévention.....	15
2.1.7 Tests de dépistage.....	17
2.1.8 Traitements.....	18
2.1.9 Les cellules MCF-7	25
2.1.10 Phénomène de résistance aux drogues	25
2.2 ARN interférent.....	30

2.2.1	Historique de l'ARN interférent.....	30
2.2.2	Mécanisme d'action des siARN.....	31
2.2.3	Les défis de l'utilisation des siARN en milieu clinique.....	33
2.2.4	Détermination de l'efficacité des siARN à l'aide de gènes de référence (housekeeping genes)	35
2.3	Chitine et chitosane	36
2.3.1	Utilisation du chitosane comme système de livraison des acides nucléiques	38
2.3.2	PEGylation du chitosane	41
2.3.3	Biodistribution et biodégradation du chitosane.....	42
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....		47
3.1	Synthèse des siARN.....	47
3.2	Préparation du chitosane 92-10-5 [DDA-Mn-N :P].....	48
3.3	Préparation des nanoparticules chitosane/siARN	49
3.4	Analyse de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN	50
3.5	Culture cellulaire	50
3.5.1	Culture des MCF-7 et MCF-7 MDR.....	50
3.5.2	H1299 eGFP ⁺	51
3.6	Procédure de transfection avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN	51
3.7	Procédure de transfection avec les lipoplexes (DharmaFect/siARN)	52
3.8	Analyse, par microscopie confocale, de l'internalisation des nanoparticules chitosane 92-10/ siGLO TM dans les cellules MCF-7 MDR.....	52
3.9	Vérification du pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN	53

3.10	Confirmation, par RT-PCR, de la présence d'ARNm spécifiques au gène MDR1	55
3.10.1	Amplification d'une séquence du gène MDR1 par PCR.....	55
3.10.2	Purification des produits PCR.....	58
3.10.3	Séquençage des amplicons par électrophorèse capillaire.....	58
3.11	Analyse quantitative du silençage du gène MDR1 par qPCR.....	59
3.11.1	La méthode.....	59
3.11.2	Test de stabilité de 8 gènes de référence	61
3.11.3	Transfection des cellules MCF-7 MDR	63
3.11.4	Traitement à la chitosanase	65
3.11.5	Extraction de l'ARN total	66
3.11.6	Quantification de l'ARN total.....	66
3.11.7	Évaluation de l'intégrité de l'ARN total	67
3.11.8	Rétrotranscription de ARN en ADNc	68
3.11.9	Amplification en temps réel (qPCR) du gène MDR 1	69
3.12	Test de cytotoxicité des nanoparticules et resensibilisation des cellules MCF-7	
	MDR à la doxorubicine	73
3.12.1	Détermination du nombre de cellule à ensemercer et le temps d'incubation	
	avec le bleu alamar	75
3.12.2	Identification de IC50 de la doxorubicine.....	76
3.12.3	Test de toxicité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN	77
3.12.4	Test de resensibilisation à la doxorubicine des cellules MCF-7 MDR	
	pré-traitées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN.....	77
3.13	Analyses statistiques	78
CHAPITRE 4 RÉSULTATS		79

4.1	Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane 92-10 /MDR1-siARN : Détermination de la taille, du potentiel zêta (ζ) et de la polydispersité (pdl)	79
4.2	Internalisation des nanoparticules chitosane 92-10 /si siGLO TM dans les cellules MCF-7 MDR	80
4.3	Vérification du pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN	82
4.4	Confirmation de la présence d'ARNm spécifique au gène MDR1 par RT-PCR	84
4.4.1	Amplification du gène (en partie) MDR1 par RT-PCR.	84
4.5	Évaluer, par qPCR, le silençage du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules à base de chitosane.	86
4.5.1	Caractérisation de la pureté et de l'intégrité de l'ARN total	87
4.5.2	Étude de la stabilité de 8 gènes de référence.....	88
4.5.1	Quantification relative du gène MDR1 codant pour la protéine P-gp par q-PCR.....	90
4.6	Resensibilisation à la Doxorubicine des cellules MCF7-MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane-siARN.....	91
4.6.1	Détermination du nombre de cellules à ensemercer et le temps d'incubation avec Alamar Bleu	92
CHAPITRE 5 DISCUSSION		101
5.1	Caractérisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN	102
5.2	Vérification du pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN	105
5.3	Microscopie confocale	106
5.4	Confirmation de la présence de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7	

MDR	107
5.5 Design et détermination des meilleurs gènes de référence pour la quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour le gène MDR1	108
5.6 Quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour le gène MDR1 et l'effet des extrémités dépassantes (overhangs) des siARN sur l'efficacité du silençage	110
5.7 Resensibilisation des cellules cancéreuses du sein à la Doxorubicine	113
CHAPITRE 6 CONCLUSION	117
BIBLIOGRAPHIE	119
ANNEXES	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 Séquences des brins sens et anti-sens des duplexes siARN_1, siARN_1M, siARN_2 et siARN_2M et la région ciblée au niveau de l'ARNm du gène ABCB1 (MDR1)	48
Tableau 3.2 Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification du gène MDR1	56
Tableau 3.3 Conditions de transfection des cellules MCF-7 MDR	64
Tableau 3.4 Composant et les volumes utilisés pour la réaction de transcription inverse d'un microgramme d'ARN total en ADNc en utilisant le kit "VILO Superscript Reverse transcription"	69
Tableau 3.5 Coefficient d'Extinction Molaire du bleu alamar	76
Tableau 4.1 Taille, potentiel zêta et polydispersité (PdI), obtenus par des techniques de diffusion dynamique de lumière (DLS), pour les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1siARN_2 et chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M.....	80
Tableau 4.2 Silençage obtenu et attendu du gène eGFP ⁺ (%) après transfection des cellules H1299 eGFP ⁺ avec le chitosane 92-10, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN, DharmaFECT/eGFP-siARN et chitosane (92-10-5)/siARN leurre.....	83
Tableau 4.3 RIN moyen de l'ARN total extrait des cellules MCF-7 et MCF-7 MDR non-transfectées, transfectées avec du chitosane (92-10), du chitosane (92-10-5)-MDR1siARN_1 et DharmaFECT-MDR1siARN_1.....	88
Tableau 4.4 Score des gènes de référence obtenu avec le logiciel ExpressionSuite.....	89
Tableau 4.5 Nombre de cellules MCF-7 et MCF-7 MDR à ensemercer dans un plateau de 96 puits et le temps d'incubation requis avec le bleu alamar pour mesurer la cytotoxicité.....	95
Tableau 4.6 IC50 de doxorubicine pour MCF-7 et MCF-7 MDR	97

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Structure 2-D de la protéine P-glycoprotéine (P-gp)	29
Figure 2.2 Mécanisme de silençage génique.....	32
Figure 2.3 Structure de la chitine	36
Figure 2.4 Production du chitosane par désacétylation de la chitine	37
Figure 3.1 Séquence de l'ADN complémentaire de l'ARN messager du gène MDR1 (NCBI : NM_000927)	57
Figure 3.2 Réaction Taqman	60
Figure 3.3 Le design expérimental pour déterminer le gène de référence à utiliser pour mesurer les variations de l'expression du gène MDR1 par qPCR	63
Figure 3.4. Le design expérimental pour déterminer l'efficacité du silençage du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane 92-10/MDR1-siARN	65
Figure 3.5 Design de la plaque 96 puits pour l'expérience de qPCR afin d'étudier la stabilité de huit gènes de référence	71
Figure 3.6 Design de la plaque 96 puits pour déterminer par qPCR le silençage du gène MDR1 en utilisant le gène de référence sélectionné POLR2A	72
Figure 3.7 Réaction de réduction dans les cellules vivantes de la forme oxydée du bleu alamar (résazurine) en une forme réduite (résorufine).....	74
Figure 4.1 Observation par microscopie confocale de l'internalisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siGLO TM dans les cellules MCF-7 MDR et de la dissociation des siGLO TM des chitosanes dans l'espace intracellulaire.	82
Figure 4.2 Profil électrophorétique du fragment obtenu suite à l'amplification d'une partie du gène MDR1 des cellules MCF-7 MDR.....	85
Figure 4.3 Fragment de l'ARNm du gène MDR1 qui a été amplifié et séquencé et qui est homologue à la séquence publiée (NCBI Reference Sequence: NM_000927.4).	86

Figure 4.4 Analyse, par qPCR, de la réduction de l'expression du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR.	91
Figure 4.5 Réduction la résazurine en fonction de la durée (heures) de l'incubation du bleu alamar avec différentes quantités/puits de cellules MCF-7ensemencées dans une plaque de 96 puits.	93
Figure 4.6 Réduction la résazurine en fonction des différentes quantités/puits de cellules MCF-7ensemencées dans une plaque de 96 puits pour différents temps d'incubation avec le bleu alamar.	93
Figure 4.7 Réduction la résazurine en fonction de la durée (heures) de l'incubation du bleu alamar avec différentes quantités/puits de cellules MCF-7-MDRensemencées dans une plaque de 96 puits.....	94
Figure 4.8 Réduction la résazurine en fonction des différentes quantités/puits de cellules MCF-7 MDRensemencées dans une plaque de 96 puits pour différents temps d'incubation avec le bleu alamar.	94
Figure 4.9 Sensibilité des cellules MCF-7 (A) et MCF-7 MDR (B) à la doxorubicine.....	96
Figure 4.10 Effet cytotoxique des nanoparticules sur les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR.....	98
Figure 4.11 Resensibilisation des cellules MCF-7 MDR à la doxorubicine.	100

LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

La liste des sigles et abréviations présente, dans l'ordre alphabétique, les sigles et abréviations utilisés dans le mémoire ou la thèse ainsi que leur signification. En voici quelques exemples :

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACTB	Actine Bêta
ADNase	Désoxyribonucléase
ADNc	ADN complémentaire
Ago2	Argonaute 2
ARNase	Ribonucléase
ARNdb	ARN double brin
ARNi	Interférence par ARN
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CH	Chitosane
Cq	Cycle seuil
DDA	Degré de Désacétylation
DLS	Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
E	Efficacité d'amplification
ELF-1a	Facteur d'élongation 1-alpha
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Sérum de veau fœtal
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate

M	Molaire
MDR	Multirésistance aux médicaments (Multi drug resistance)
MIQE	Minimum Information for publication of qPCR Experiments (Informations minimales pour la publication d'expériences de qPCR)
Mn	Masse Moléculaire
NAC	No Amplification Control
N:P	Charge chitosane/acides nucléiques (amine:phosphate)
NT	Non-transfecté
NTC	No template contrôle
NRTC	No Reverse Transcriptase Control
Pb	Paire de base
PBGD	Porphobilinogène déaminase
PDI	Indice de polydispersité
PEG	Polyéthylène Glycol
RES	Système réticulo-endothélial
PCR	Amplification en chaîne par polymérase
P-gp	Protéine P-glycoprotéine
POLR2A	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A
PUM1	Homologue of Pumilio 1
RT	Réverse Transcription
RISC	RNA-induced silencing complex

RIN	RNA Integrity Number
RNase	Ribonucléase
qPCR	Amplification en chaîne par polymérase en temps réel
TBP	TATA box binding protein
TFRC	Récepteur de Transferrine
siARN	Short Interference RNA
shARN	Petit ARN épingle à cheveux (<i>small hairpin RNA</i>)
V	Volt

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Résultats bruts de cytométrie en flux. Les cellules H1299 eGFP ⁺ ont été transfectées avec le chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN.....	149
Annexe 2. Bioanalyzer - Électrophérogrammes du Nombre d'intégrité de l'ARN total (RIN) extrait des cellules MCF-7 et MCF-7 MDR non-transfectées, traitées avec du chitosane (92-10) et transfectées avec des nanoparticules chitosane(92-10-5)/MDR1-siRNA_1 et des lipoplexes DharmaFect)/MDR1-siRNA_1	150

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le cancer est considéré comme un problème majeur au Canada avec des coûts de 17,4 milliards de dollars et une probabilité de 46% de se développer chez les hommes et 41% chez les femmes.[7] La Société canadienne du cancer estime qu'en moyenne, chaque jour, 539 Canadiens seront diagnostiqués avec un cancer, et 214 en mourront. Parmi les cancers existants, le cancer du sein prend les devants dans les pays industrialisés (exception des É.U. et Grande-Bretagne). Le cancer est plus fréquent chez les femmes, surtout celles âgées entre 50 et 60 ans, avec une estimation de 25 000 nouveaux cas en 2015 dans le monde. [8, 9] Vu le nombre ascendant de personnes touchées par le cancer du sein avec les années, des efforts importants en recherche sont déployés afin de trouver des techniques sensibles de dépistage précoce du cancer et des traitements efficaces contre des formes plus avancées. Pour ce faire, les scientifiques ont dû proposer des modèles afin d'étudier l'efficacité de nouveaux traitements.

En 1970, une lignée cellulaire du cancer du sein (MCF-7), exprimant le récepteur d'oestrogène, a pris son origine d'un prélèvement effectué sur une patiente souffrant d'un cancer métastatique du cancer du sein.[10] Aujourd'hui les cellules MCF-7 sont couramment utilisées en recherche biomédicale. Ces cellules sont d'un grand intérêt parce qu'elles peuvent devenir résistantes aux traitements déjà existants (p.ex. Cyclophosphamide, Docetaxel, Doxorubicine, Epirubicin, Methotrexate, Paclitaxel, etc.).[11] Les cellules MCF-7, ont été choisies pour ce projet, car elles constituent un modèle de choix pour évaluer le potentiel d'un traitement contre les tumeurs métastatiques et résistantes aux médicaments.[12]

Suite à une mutation, translocation, délétion, amplification, ou à une erreur de transcription/traduction d'un ou de plusieurs gènes, l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose cellulaire peut être altéré. Ce déséquilibre peut aboutir à l'apparition d'une population cellulaire à division incontrôlée menant à un cancer.[13] Quand la masse cellulaire cancéreuse migre et envahit d'autres organes/tissus, on parle alors de métastase. La métastase est ainsi la transformation de cellules cancéreuses bénignes (locales) en cellules cancéreuses malignes envahissant les organes à proximité ou distants. Il existe différents types de cancer dont le cancer de la bouche, la gorge, la langue, la peau, la prostate, la thyroïde, la vessie, l'estomac et le duodénum, l'œsophage, l'ovaire, des bronches, du col de l'utérus, du colon et du rectum, du foie, du larynx, du pancréas, des poumons, rein, sein, testicule, lymphoïde chronique, myéloïde

chronique, lymphome, la moelle épinière et de l'os. [14] Les causes spécifiques menant à l'apparition d'un cancer sont toujours inconnues, mais des facteurs externes (environnement, radiations) et internes (altération du système immunitaire, prédisposition génétique) semblent y jouer un rôle important. [13]

Le traitement du cancer du sein est spécifique à chaque patient, cependant les premières étapes sont généralement communes à tous. Dans le cas d'une petite tumeur, les médecins recommandent une chirurgie afin d'éliminer la masse tumorale et le tissu en périphérie pour assurer une élimination complète des cellules cancéreuses. Dans le cas d'une tumeur plus imposante, une chimiothérapie néoadjuvante (avant la chirurgie) est recommandée. Après la chirurgie, une thérapie adjuvante est nécessaire afin de minimiser le risque de récurrence de la tumeur et éliminer toute cellule cancéreuse restante. Dépendamment du niveau de risque de récurrence, cette thérapie adjuvante peut inclure la radiothérapie, l'hormonothérapie, la thérapie biologique et la chimiothérapie. La chimiothérapie est une intervention caractérisée par l'emploi d'agent cytotoxique afin de bloquer la division d'une cellule néoplasique et ainsi engendrer sa mort. Les chimiodrogues les plus utilisées dans le cas du cancer du sein incluent les taxanes (paclitaxel/Taxol® and docetaxel/Taxotere®), et les anthracyclines (doxorubicin/Adriamycin® et epirubicin/Ellence®). Dans le but d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie, plusieurs chimiodrogues sont administrées de façon combinée. Ainsi, les anthracyclines et/ou les taxanes peuvent être combinées avec d'autres chimiodrogues comme le carboplatine, le fluorouracile et la cyclophosphamide.[15] La thérapie adjuvante permet de diminuer le risque de récurrence du cancer, mais malheureusement n'assure pas la guérison du patient.[16] Ce manque d'efficacité est relié à plusieurs facteurs dont le stade du cancer (métastatique ou non), l'âge du patient, l'état de sa santé et le statut de l'expression des récepteurs de l'estrogène (ER), de la progestérone (PR) et du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique (Her2) dans la tumeur. [16]

Une caractéristique qui définit bien les cellules cancéreuses agressives ou métastatiques est l'acquisition d'une résistance aux médicaments. Une cellule cancéreuse qui est exposée à un agent cytotoxique va développer une résistance à l'agent même et à divers agents ayant des similitudes structurelles et fonctionnelles. La forme agressive des cancers est souvent associée avec la surexpression de l'un de ces deux gènes : Her2 ou Topoisomerase II (Top2). [17, 18] Dépendamment du gène surexprimé (Her2 ou Top2), différents médicaments peuvent être

employés pour traiter le patient (Herceptin dans le cas de Her2 ou Etoposide dans le cas de Top2).

Une des causes majeures de la résistance des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux est la protéine P-glycoprotéine (P-gp) codée par le gène MDR1 (appelé aussi ABCB1). Cette protéine, ayant une demi-vie entre 14 et 17 heures, est le premier transporteur ABC «*ATP-binding cassette transporters*» identifié comme étant surexprimé dans les cellules cancéreuses ayant une résistance multiple aux drogues (MDR). [3, 19-21] La P-gp joue le rôle d'une pompe qui expulse les chimiodrogues à l'extérieur de la cellule et elle est donc responsable de la diminution de l'accumulation des médicaments dans les cellules cancéreuses et de la réduction de l'efficacité de la chimiothérapie. La P-gp permet ainsi aux cellules cancéreuses MCF-7 de résister à plusieurs médicaments, dont la doxorubicine.

Des études *in vitro* ont été réalisées afin de comprendre les autres mécanismes de résistance à la doxorubicine. Parmi ces mécanismes, on note des mutations de la protéine p53 (une protéine apoptotique, antitumorale), une augmentation de synthèse de la thymidylate synthase et de la glutathione-S-transférase[22-25], des mutations dans les chaînes alpha et bêta de la tubuline[26, 27], une amplification de la sérine-thréonine kinase AURORA-A, une suppression de la phosphorylation de la protéine Bcl-xL par la protéine JNK, une diminution de la régulation de la protéine Bcl-2 et finalement une augmentation de l'expression de la protéine Akt.[28-31]

En résumé, la protéine P-gp, surexprimée dans les cellules cancéreuses, est l'une des causes majeures du développement d'une résistance aux médicaments et de l'échec de la chimiothérapie chez les patients souffrant d'un cancer. Ce problème de résistance pourrait être résolu par la réduction de l'expression de la P-gp. Le "silencage" de la P-gp peut s'effectuer par l'utilisation des ARN interférents (ARNi).[3, 32-34] Les siARN, "small interfering RNA", sont des petits ARN double brin induisant un silencage spécifique du gène d'intérêt par la liaison du brin sens du siARN à sa séquence complémentaire de l'ARN messenger. Les siARN, avec l'implication d'un complexe nommé RISC, mènent à la dégradation de l'ARN messenger spécifique et à la répression de sa traduction en protéine.

Les siARN peuvent donc susciter un silencage spécifique post-transcriptionnel d'un gène ciblé et peuvent être utilisés pour silencer le gène MDR1. En théorie, ceci permettra une diminution de l'expression de la protéine P-gp, une augmentation de la concentration

intracellulaire de médicaments et ainsi à une restauration de la fonction de sensibilité des cellules cancéreuses aux médicaments.[3] Plusieurs auteurs ont démontré le potentiel des siARN pour réduire l'expression de la P-gp *in vitro* et *in vivo*. [3, 4, 19, 35-38] Cependant, un silençage incomplet du gène MDR1 a été obtenu en utilisant les siARN. Cette inhibition incomplète a été attribuée à une grande quantité de P-gp, à sa longue demi-vie, et surtout à la faible efficacité de transfection.[3]

La transfection est une étape primordiale dans le processus de silençage, car elle permet l'entrée des siARN dans les cellules puis leur action au niveau du cytoplasme. Une faible efficacité de transfection peut s'expliquer par l'absence d'un système de livraison efficace qui permettrait aux siARN d'atteindre les cellules ciblées en empêchant leur digestion extracellulaire par les enzymes du plasma et leur élimination rénale. Afin de surmonter ces difficultés, il est nécessaire de développer des systèmes de livraison efficaces non toxiques et qui ne suscitent pas de réponse inflammatoire et immunitaire [39] Parmi les systèmes de livraison existants, les lipides sont largement utilisés comme système de livraison de l'acide nucléique. Malgré qu'efficaces, les liposomes peuvent entraîner une forte toxicité.[40-42]

Il était ainsi important de choisir un nouveau système de livraison qui ne soit pas toxique. Le chitosane est polysaccharide naturel, biocompatible, mucoadhésif et biodégradable, qui a été étudié dans notre laboratoire pour son potentiel comme système de livraison d'ADN et d'ARN à des fins thérapeutiques.[43, 44] Le chitosane forme des nanoparticules par attraction électrostatique en condensant l'acide nucléique. La formation des nanoparticules est donc un procédé simple, rapide et peu coûteux. Une transfection réussie des cellules avec des nanoparticules à base de chitosane nécessite l'utilisation d'une formulation adéquate. Les propriétés biologiques du chitosane sont définies par sa masse molaire moyenne (Mn) et par son degré de désacétylation (DD).[45] Le ratio N :P, correspondant au ratio d'amide du chitosane et de phosphate de l'acide nucléique, peut aussi influencer la formation des complexes et ainsi l'efficacité de la transfection. Ainsi, les formulations de chitosane utilisées sont identifiées en fonction de ces trois caractéristiques DDA-Mn-N :P. Des travaux dans nos laboratoires ont démontré que le pouvoir de transfection avec l'ADN plasmidique est maximisé avec l'utilisation d'une formulation ayant un haut DDA avec une petite Mn ou un faible DDA avec une grande Mn. [46] Cependant, il est important de noter que la première combinaison n'active pas le système immunitaire, contrairement à la deuxième.[47]

Les travaux de recherche réalisés par Lavertu et al. (2006) ainsi que Jean et al. (2009, 2011 et 2012) de notre équipe ont permis de tester la toxicité et l'efficacité de transfection de diverses combinaisons de chitosane ayant des DDA de 98%, 92%, 80% et 72% , et des Mn de 150, 80, 40 et 10 kDa. [44, 47-49] Les résultats obtenus démontrent que le chitosane 92-10-5 (DDA-Mn-N:P) donnait le meilleur rendement de transfection et aucune toxicité observée. Étant donné les propriétés biodégradables du chitosane, ainsi que les résultats démontrant le grand pouvoir de transfection et les propriétés non toxiques du chitosane (92-10-5), cette formulation a été choisie pour ce projet de recherche.[44, 47-49]

Hypothèse et Objectifs du projet

Pour cette étude, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN permettrait de réduire l'expression du gène MDR1 et de resensibiliser les cellules MCF-7 MDR, présentant une résistance multiple aux drogues. Pour vérifier notre hypothèse, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Préparer et caractériser quatre types de nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siARN-MDR1 dont les duplexes ciblent deux régions du gène MDR1 et dont les bouts dépassants en 3' sont formés soit d'acide ribonucléique ou d'acide désoxyribonucléique.
- Analyser l'internalisation des nanoparticules chitosane-siARN dans les cellules MCF-7 MDR par imagerie confocale.
- Tester le pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN en utilisant des cellules H1299 eGFP⁺ qui expriment de façon continue la protéine eGFP.
- Confirmer la présence et l'intégrité d'ARNm spécifique au gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR
 - Amplifier un fragment du gène MDR1 par RT-PCR
 - Confirmer l'intégrité du fragment du gène MDR1 par un séquençage suivi d'une analyse d'homologie.
- Déterminer la capacité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siARN-MDR1 à inhiber l'expression du gène MDR1.

- Mettre au point un test qPCR spécifique pour quantifier les variations du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR en déterminant préalablement le gène de référence ayant la meilleure stabilité.
- Déterminer l'effet des différents duplexes utilisés dans les nanoparticules à base de chitosane sur le silençage du gène MDR1.
- Déterminer la cytotoxicité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN.
- Déterminer IC50 de la doxorubicine pour les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR.
- Évaluer la resensibilisation à la doxorubicine des cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN.
 - Déterminer l'effet des différents duplexes utilisés dans les nanoparticules à base de chitosane sur la resensibilisation des cellules à la doxorubicine.

La réalisation de ces objectifs est importante pour évaluer le potentiel de nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siARN-MDR1 à resensibiliser des cellules devenues résistantes aux chimiodrogues. Si les nanoparticules s'avèrent efficaces, nous aurons contribué à l'amorçage d'un traitement de nouvelle génération contre les cancers résistants à la chimiothérapie.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Le Cancer

2.1.1 Définition

L'accumulation de plusieurs mutations dans des endroits spécifiques du génome peut aboutir à l'apparition d'une ou de plusieurs maladies. Dans certains cas, ces dernières peuvent mener à la division non contrôlée d'une ou de plusieurs cellules du corps. Cette croissance cellulaire incontrôlée, si elle n'est pas freinée par le système de défense du corps, sera responsable du développement d'une tumeur (néoplasme). Une tumeur peut se développer dans l'un des différents organes du corps, ou même dans plusieurs organes à la fois. On note plus que 200 cancers différents, les plus répandus au Canada sont le cancer de la prostate, du poumon, colorectal et du sein.[50, 51] La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse est accompagnée d'un changement de morphologie et d'une acquisition de caractéristiques propres aux cellules cancéreuses dont la division rapide et infinie et la perte de l'inhibition de croissance par contact.[52] Deux types de tumeurs existent: les tumeurs malignes et les tumeurs bénignes. Les cellules cancéreuses malignes se divisent d'une façon irrégulière et rapide et sont capables de quitter le lieu où le cancer a pris naissance pour aller envahir d'autres régions/organes de l'organisme. Le cancer malin est caractérisé par cinq astuces de propagation. Tout d'abord, il oblige le maintien de sécrétion de signaux prolifératifs assurant alors la division de ces cellules d'une façon continue. Ensuite, les cellules cancéreuses malignes métastasent pour aller envahir d'autres endroits de l'organisme. De plus, les tumeurs malignes ont développé des mécanismes pour échapper aux signaux inhibiteurs de croissance. Finalement, ces cellules immortelles métastatiques, une fois arrivées dans un nouveau tissu, vont induire le développement de vaisseaux sanguins autour de la tumeur pour assurer l'arrivée en abondance de sources nutritives pour ainsi garantir la survie et le développement de la tumeur. Ce phénomène s'appelle angiogenèse.[53, 54]

2.1.2 Cancers somatiques et héréditaires

Des mutations touchant certains gènes peuvent causer l'apparition de tumeurs. Les cancers peuvent être soit somatiques soit héréditaires. Il est important de noter qu'une mutation génétique

n'aboutit pas directement et obligatoirement au développement d'un cancer, mais elle peut favoriser l'apparition de ce dernier.

Entre 90 et 95% des cancers sont somatiques.[55] Une personne atteinte d'un cancer somatique a subi une ou des mutations génétiques au cours du développement fœtal, de l'enfance ou pendant l'âge adulte, mais ne transmettra pas ce cancer à la génération suivante.

Entre 5 et 10% des cancers peuvent être causés par un gène anormal qui est transmis de génération en génération.[55] C'est ce qu'on nomme un cancer héréditaire. Par exemple, il a été montré que des patients ayant certaines mutations héritées dans deux gènes suppresseurs de tumeurs BRCA1 et BRCA2, présenteront un risque de plus que 75% de souffrir d'un cancer ovarien, colorectal et du sein.[56]. Lorsqu'une personne hérite, de son père ou de sa mère, une copie anormale d'un ou plusieurs gènes, elle est prédisposée à développer un cancer. Lorsque la deuxième copie du gène est atteinte, le gène sera non-fonctionnel et un cancer pourrait ainsi se développer. Les individus formés à partir d'un zygote comportant déjà une copie du gène altérée auront tendance à développer des cancers plus précocement comparativement à ceux ayant hérité deux copies de gènes sains soumis à une mutation au cours de leur vie.

2.1.3 Causes

Lorsqu'une cellule saine se transforme en une cellule cancéreuse, les gènes impliqués dans la détection et la réparation des mutations sont défectueux ou inhibés. Sans ces gènes contrôles, la cellule se divise d'une façon incontrôlée et transfère les mutations acquises durant la mitose à ces cellules filles. Ces dernières échappent à l'apoptose et seront à leur tour des cellules cancéreuses.

Au fil des années, le nombre de décès attribués au cancer est toujours en augmentation continue et les scientifiques sont toujours à la recherche de causes directement responsables de l'apparition de mutations cancérogènes. De mauvaises habitudes de vie comme le tabagisme, un régime alimentaire inapproprié, le stress, le manque de sommeil et d'exercice, ainsi que certains facteurs environnementaux comme l'exposition à des radiations, les infections, les polluants environnementaux, et des maladies comme le diabète, sont majoritairement responsables de l'apparition du cancer. Dans le restant des cas, des facteurs génétiques sont à blâmer.[57] Il est

bien important de noter le fait que ces facteurs ne sont que des prédispositions à un cancer et non des causes directes du développement d'une tumeur.

2.1.3.1 Proto-Ocogènes, oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes régulateurs de la croissance cellulaire comprennent (1) les gènes suppresseurs de tumeurs qui permettent de réduire l'expansion et (2) les oncogènes qui, au contraire, stimulent la croissance. La transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse est ainsi causée par l'inhibition de l'activité des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou de la surexpression des oncogènes.[58, 59]

2.1.3.1.1 Proto-Oncogènes et Oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes qui codent pour des protéines jouant un rôle important dans la croissance cellulaire. Lors d'une déficience des gènes de régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, les probabilités qu'un cancer se développe sont élevées.[60, 61] Parmi les proto-oncogènes identifiés, on note HER2 et RAS. Le gène RAS est un proto-oncogène qui code pour une protéine jouant un rôle dans la transduction du signal intracellulaire. La mutation du gène RAS le transforme en un oncogène qui code pour une oncoprotéine responsable de la livraison excessive de signaux déclenchant une division cellulaire non contrôlée.[62] Les mutations de RAS sont très rares au niveau de cancer du sein. Cependant, dans le cas du cancer du sein, RAS peut être pathologiquement suractivé par la surexpression des récepteurs des facteurs de croissance (récepteurs des EGF et ErbB-2) dont les voies de signalisation impliquent RAS (Von Lintig FC et al., 2000).[63]

Un autre exemple d'un proto-oncogène bien connu est le gène HER2 qui code pour le récepteur tyrosine kinase connue sous le nom de récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2. Les mutations touchantes HER2 sont retrouvées dans 20% à 30% des cancers du sein.[64-66] Cette protéine est impliquée dans la division, la croissance et la réparation des cellules du sein. Les cellules ayant plus qu'une copie du gène HER2 auront une surproduction de la protéine HER2 ce qui aboutit à une division cellulaire non-contrôlée.[67, 68]

Lorsque les proto-oncogènes subissent des mutations, ils peuvent se transformer en oncogènes qui peuvent être continuellement actifs et ainsi aboutir à une division cellulaire incontrôlée. Cette division cellulaire anormale sera responsable de l'apparition de cancer. La

transformation d'un proto-oncogène en oncogène survient suite à un réarrangement chromosomique ou peut être causée par une duplication génique (présence d'une copie additionnelle du gène qui va aboutir à un excès de protéines traduites).

2.1.3.1.2 Gènes suppresseurs de tumeurs

Contrairement aux proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs sont impliqués dans l'induction de l'apoptose. Ils codent pour des protéines qui vont "freiner" la division cellulaire pour ainsi corriger les dommages au niveau de l'ADN. Lorsque les gènes suppresseurs de tumeur sont touchés par une mutation induisant leur inhibition, les cellules vont se diviser trop rapidement et des mutations seront accumulées dans le génome empêchant les cellules d'entrer en apoptose. De telles mutations augmentent le risque d'apparition de cancer. Une surexpression d'une protéine p53 mutée a été observée dans la plupart des cancers. [69-71] Le gène p53 est situé sur le chromosome 17 humain et code pour la protéine p53 impliquée dans la régulation des fonctions cellulaires importantes comme l'apoptose.[72, 73] Suite à un stress cellulaire comme un dommage au niveau de l'ADN cellulaire, la protéine p53 normale dite sauvage est activée. Son activation permet ainsi d'arrêter le cycle cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN en question et/ou de déclencher l'apoptose dans le but de prévenir la naissance de cellules avec des dommages au niveau de l'ADN. Une fois la réparation est effectuée, la cellule reprend le cycle cellulaire normal.[74, 75] La version mutée du gène p53 possède un potentiel oncogénique et agit comme un inhibiteur dominant pour la protéine sauvage p53.

BRCA1 et BRCA2 sont deux gènes suppresseurs de tumeurs exprimés chez tous les humains dans plusieurs tissus, mais surtout dans les cellules mammaires. La protéine codée par BRCA1 et BRCA2 est responsable de la réparation d'ADN et donc dans le maintien de l'intégrité génomique. Les mutations au niveau des gènes BRCA1 et BRCA2 ont des répercussions directes au niveau des protéines correspondantes : ceci aboutit à des protéines ne fonctionnant pas proprement, ou même à l'absence de traduction. De telles mutations vont favoriser le développement d'altérations additionnelles au niveau du génome, et sont impliquées dans plusieurs types de cancers, dont le cancer du sein et des ovaires. Ces mutations comptent pour 5 à 10% de tous les cancers du sein, et 20 à 25% des cancers du sein héréditaires (Easton DF, 1999; Campeau PM et al., 2008).[76, 77]

2.1.3.2 Diète, Alcool et Exercices

Des études ont montré que plusieurs cancers dont le cancer de la bouche, du pharynx, du larynx, de l'œsophage, du foie, du colon et du rectum, et du sein, sont en corrélation étroite avec la consommation de l'alcool. [78] D'une part, l'alcool peut jouer le rôle d'irritant et pourra ainsi entraîner des dommages aux tissus de l'organisme. Les cellules endommagées entrent dans un processus de réparation qui peut parfois entraîner des changements dans les séquences de l'ADN. Ces modifications peuvent mener à l'apparition d'un cancer. Dans le colon et le rectum, les bactéries peuvent transformer l'alcool en acétaldéhyde, qui est un carcinogène. D'autre part, l'alcool peut jouer le rôle d'un solvant afin d'aider des substances chimiques dangereuses, comme celles contenues dans le tabac, à se rendre à l'intérieur des cellules qui tapissent le tube digestif. Ceci pourrait expliquer pourquoi la combinaison d'alcool et de tabagisme est beaucoup plus susceptible de provoquer des cancers de la bouche ou de la gorge que l'alcool ou le tabagisme seul.[78] De plus, l'alcool peut diminuer la capacité de l'organisme à absorber l'acide folique contenu dans des aliments. Ceci peut présenter un risque dans l'apparition du cancer du sein ou colorectal chez les personnes qui manquent de vitamine B (acide folique) dans leur diète. [78] Ensuite, l'alcool peut augmenter les niveaux d'œstrogène dans le corps, ce qui pourra favoriser le développement du cancer du sein.

Finalement, l'obésité ou le surpoids associés à la diète et l'exercice sont connus comme étant des facteurs qui favorisent l'apparition de cancer. Il a été prouvé qu'un régime alimentaire mal sain et pauvre en fruits, végétaux et grains entiers, riche en viande rouge et sel, ainsi le manque d'exercice, prédisposent l'individu à développer une tumeur.[79] En fait, le 26 Octobre 2015, le Centre International de Recherche sur le Cancer a lancé un communiqué de presse selon lequel il a décrit la viande rouge et la viande transformée comme probablement cancérigène et cancérigène pour l'Homme, respectivement.[80-82]

2.1.3.3 Système immunitaire

Certaines maladies et certains traitements peuvent être associés à une immunodéficience qui augmente les risques d'un patient de développer un cancer. L'immunodéficience est un affaiblissement du système immunitaire qui le rend moins efficace dans l'éradication d'intrus comme des virus, des bactéries ou de cellules anormales comme les cellules cancéreuses.

L'affaiblissement du système immunitaire favorise les infections et, par le fait même, les cancers causés par des virus. Les individus infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et atteints du sida montrent un déficit profond en lymphocytes $CD4^+$ qui sont des cellules nécessaires pour combattre les infections et certains cancers. En effet, cette immunodéficience favorise des infections opportunistes comme l'infection par le virus du papillome humain (VPH) qui peut provoquer un cancer du col de l'utérus ou un cancer anal et l'infection par l'herpès-virus humain 8 qui peut provoquer le sarcoma de Kaposi. On nomme oncovirus un virus qui cause un cancer. Parmi les divers oncovirus, on note le virus du papillome humain (VPH), virus Epstein-Barr (EBV), les virus de l'hépatite B et C, l'herpès virus humain type 8 (HHV-8) et le virus T-lymphotrope humain (HTLV), etc.

D'autre part, les patients ayant subi une allogreffe sont soumis à une sévère médication, constituée d'immunodépresseurs, afin d'éviter un rejet engendré par le système immunitaire qui reconnaît les cellules de la greffe ou de l'organe transplanté comme du non-soi. Les immunosuppresseurs sont nécessaires à la réussite de l'intervention, mais rendent le patient plus vulnérable aux infections et aux développements de tumeurs.

Le risque d'incidence de cancer est plus élevé chez les personnes ayant reçues une transplantation d'organe solide par rapport à la population générale. (Gutierrez-Dalmau et al., en 2007).[83] En effet, les lymphoprolifération post-transplantation et les cancers cutanés sont les cancers les plus courants chez les personnes transplantées (Buell et al., 2005).[84] Selon une étude menée par Taylor et al. en 2008, parmi les personnes ayant survécu à une greffe cardiaque, 32% développeront une néoplasie dans les 10 prochaines années suivant l'opération.[85] De plus, une étude comparative menée par Grulich AE et al., en 2007, a été effectuée afin de comparer l'incidence du cancer chez les personnes infectées par le VIH et chez celles immunodéprimées suite à une transplantation d'organe. La similitude de l'incidence du cancer au niveau de ces deux groupes suggère que c'est l'immunodéficience, et non les autres facteurs de risque du cancer, qui est responsable de l'augmentation du risque d'apparition du cancer.[86]

2.1.3.4 Causes chimiques et radiations

L'accumulation de plusieurs mutations dans l'ADN peut induire une division cellulaire incontrôlée et des pouvoirs cellulaires métastatiques. Ces mutations sont causées par des agents qu'on nomme des mutagènes. Lorsque ces mutations aboutissent à un cancer, on leur donne le

nom de carcinogènes. Il est important de noter que la plupart des mutagènes sont des carcinogènes, mais pas tous les carcinogènes sont des mutagènes.[87] En effet, l'alcool par exemple est un carcinogène et un mutagène : le métabolisme de l'alcool (éthanol) génère l'acétylaldéhyde (AA) et des radicaux libres.[88] C'est l'AA qui est responsable du caractère carcinogène et mutagène de l'alcool. L'AA est produit par des hydrogénases, les cytochromes P-4502E1 et à partir du métabolisme oxydatif des bactéries dans le tractus supérieur et inférieur gastro-intestinal.[89] L'AA se lie à l'ADN et aux protéines, détruit le folate et aboutit à une prolifération cellulaire incontrôlée. Le caractère carcinogène de l'alcool se traduit aussi par : des altérations au niveau de la durée du cycle cellulaire engendrant une hyperprolifération; une stimulation de la synthèse des cytochromes P-4502E1 responsables de la production importante de radicaux libres; des déficiences nutritionnelles en folate, vitamine E, zinc, phosphate pyroxydable; et des infections virales causées par des altérations au niveau du système immunitaire.[90, 91]

D'autre part, la nitrosamine, les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont parmi les 70 substances chimiques contenues dans la fumée des cigarettes et qui ont été prouvées comme étant des carcinogènes. Ces substances ont ainsi classé le tabagisme comme la cause de divers cancers (du poumon, du cerveau, du larynx, de l'estomac, de la vessie, de l'œsophage et du pancréas).[92]

Les radiations ionisantes (images médicales, etc.) ou non ionisantes (UV) sont liées au développement des tumeurs chez les individus exposés.[55] Ces tumeurs prennent généralement entre 10 et 40 ans pour se développer, sauf dans le cas d'une leucémie (cancer des cellules de la moelle osseuse) où la maladie se manifeste entre 2 et 10 ans. À titre d'exemple, le cancer de la peau est causé par l'exposition directe aux rayons UV solaires.[93-95] Les cellules cancérigènes basales et squameuses ont tendance à se retrouver sur les parties du corps exposées au soleil, et leur occurrence est liée à l'exposition au soleil. Cependant, sachant que les radiations ne sont pas des mutagènes/carcinogènes forts, elles ne sont généralement pas suffisantes pour induire le développement d'un cancer. Elles deviennent une vraie menace une fois combinées à d'autres mutagènes/carcinogènes (ex. tabac, radon).

Il est important de noter qu'afin que les radiations puissent déclencher le développement d'un cancer, il faut qu'elles altèrent des endroits spécifiques des chromosomes et qu'elles induisent des cassures, l'inactivation d'un ou plusieurs gènes, la délétion de région (s) chromosomique (s) ou la

translocation d'une partie ou d'un chromosome en entier sur un autre chromosome. Ces mutations vont ainsi favoriser la division incontrôlée d'une cellule et la naissance d'une tumeur. Dans une cellule saine, il existe des mécanismes de régulation qui permettent de corriger les erreurs engendrées. En effet, des dommages au niveau du matériel génétique déclenchent la mort programmée cellulaire, c'est-à-dire l'apoptose. Cependant, il est possible qu'une cellule ayant reçu des mutations au niveau du génome suite à son exposition à des radiations reste en vie. Ceci peut être la cause d'une déficience des mécanismes de contrôle, et pourra donner une cellule cancéreuse. Des mutations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs sont davantage susceptibles de causer des cancers.

2.1.4 Diagnostique

Le développement d'un cancer s'accompagne de certains signes et symptômes qui permettent de diagnostiquer la maladie. La confirmation de la présence d'une tumeur se fait par un pathologiste lors de l'examen d'un échantillon tissulaire (endoscopie et biopsie), par analyses sanguines ou par imagerie médicale. Parmi les méthodes employées en imagerie médicale, on note l'imagerie en rayons X (radiographie et scanner), la résonnance magnétique (IRM), l'échographie, et le PET-scan. [96, 97]

Dans le cas de cancer du sein, le symptôme le plus commun est l'apparition d'une masse généralement indolore, dure, à forme irrégulière ou circulaire. D'autres symptômes incluent le gonflement de tout ou d'une partie du sein, une irritation de la peau, une douleur au niveau du sein ou du mamelon, une rétraction du mamelon, une rougeur, desquamation, ou un épaissement de la peau du mamelon ou du sein, et un écoulement liquide à travers le mamelon (autre que le lait maternel).[98, 99]

Afin de décider le meilleur traitement pour le patient, le pathologiste doit effectuer le diagnostic du tissu. L'examen du tissu permettra d'indiquer le type de cellules cancéreuses en voie de prolifération, les anomalies génétiques et la classification histologique (mesure du progrès de la tumeur). Les informations sur le pronostic du cancer peuvent être obtenus à partir, entre autres, des tests d'immunohistochimie et des tests cytogénétiques permettant d'étudier les changements moléculaires responsables du caractère cancérigène des cellules cancéreuses.

2.1.5 Métastases et effets systémiques

La caractéristique métastatique des cellules cancéreuses est responsable de l'apparition de divers symptômes chez les patients. Ces symptômes sont souvent causés par les tumeurs qui ont métastasé et non pas par les tumeurs primaires. Parmi ces symptômes, on note une fièvre persistante, des pertes de poids et d'appétit et une fatigue excessive non expliquée. Les plus courants sont l'élargissement des ganglions lymphatiques, du foie (hépatomégalie) et de la rate (splénomégalie). [100]

2.1.6 Prévention

La prévention se définit comme les différents moyens permettant de minimiser les chances de développer un cancer. La majorité des facteurs favorisant l'apparition d'un cancer sont d'origine environnementale, mais peuvent être contrôlés par un style de vie sain en réduisant la consommation de tabac, d'alcool, en évitant l'obésité, le diabète, la mauvaise alimentation, l'inactivité physique, les infections sexuellement transmissibles, les environnements pollués et l'exposition prolongée et non protégée au soleil, etc.

La diète joue un rôle important dans la prévention au cancer. Par exemple, des études associent la consommation de viande rouge et traitée à un risque élevé de cancer de sein, du colon et du pancréas. Ceci pourra être relié à la naissance de cancérigènes lors de la cuisson à de hautes températures.[101, 102] Comme moyen de prévention, un régime alimentaire riche en végétaux, fruits, grains entiers et poissons, et faible en viande (rouge, traitée), en graisse animale et en carbohydrates raffinés, peut être suivi pour minimiser tout risque d'apparition de tumeur(s). [103, 104]

2.1.6.1 Les vaccins anti-cancer

Il a été découvert que le système immunitaire peut être efficace pour reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses.[105, 106] Des substances connues sous le nom de modificateurs de la réponse biologique sont utilisées comme vaccins contre le cancer. Leur mode d'action consiste à utiliser des substances synthétisées par des organismes vivants ou dans un laboratoire afin de rétablir ou stimuler la réponse immunitaire pour combattre les maladies et les infections. Ces vaccins visent des cellules cancéreuses spécifiques et peuvent aussi aider à minimiser les effets secondaires de certains traitements anticancéreux.[106]

Deux types de vaccins existent : les vaccins préventifs et les vaccins thérapeutiques. Les premiers ont pour but de prévenir un développement du cancer chez les personnes saines, et les deuxièmes ont été inventés dans le but de traiter un cancer existant afin d'augmenter la réponse immunitaire anti-cancéreuse.[106, 107] Les deux types de vaccins se basent sur le principe de reconnaissance d'antigènes qui sont facilement reconnus par le système immunitaire comme du non-soi c.-à-d. comme une substance étrangère à éradiquer.

Le premier vaccin thérapeutique approuvé par la FDA ("Food and Drug Administration") le 29 Avril 2010 fut le Provenge (sipuleucel-T).[108] Ce vaccin est utilisé chez les patients atteints d'un cancer de prostate métastatique et agit en stimulant la réponse immunitaire contre un antigène se trouvant sur la majorité des cellules cancéreuses du prostate, nommé la phosphatase acide prostatique (PAP).[106, 109] Les vaccins thérapeutiques agissent sur les cancers qui se sont déjà placés afin de bloquer la croissance cellulaire de la tumeur et/ou pour éliminer toute cellule cancéreuse. Plusieurs types de vaccins thérapeutiques existent dont, entre autres, les vaccins à base de cellules tumorales entières, les vaccins à base de cellules dendritiques et les vaccins antigéniques. Les vaccins à base de cellules tumorales entières sont préparés à partir des cellules cancéreuses du patient traité (vaccin autologue) ou d'autre personne atteinte du même type de cancer (vaccin allogénique). Les cellules cancéreuses sont prélevées suite à une chirurgie ou une biopsie et sont par la suite détruites par radiothérapie avant d'être injectées dans la personne souhaitant recevoir le vaccin. Les cellules injectées présentent toujours les antigènes à leur surface et vont engendrer une réaction immunitaire, mais ne formeront pas d'autres tumeurs. Similaires aux vaccins à base de cellules tumorales entières, les vaccins à base de cellules dendritiques sont formés de cellules tumorales ainsi que des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques de la personne qui recevra le vaccin sont prélevées du sang et sont exposées aux antigènes des cellules tumorales. Elles sont par la suite injectées à cette même personne et permettront d'aider le système immunitaire à reconnaître et détruire les cellules cancéreuses présentant les mêmes antigènes que ceux présentés par les cellules dendritiques. Les vaccins antigéniques utilisent des parties de protéines, ou même des protéines spécifiques entières qui sont présentes sur les cellules cancéreuses, et qui sont nommées des antigènes. Les vaccins antigéniques sont formés d'un mélange d'antigènes et d'adjuvants. Les adjuvants (souvent des cytokines comme l'interleukine 2) sont des substances qui permettent de renforcer la réaction du système immunitaire et rendent ainsi le vaccin plus efficace.[110]

Parmi les vaccins préventifs, il y a le vaccin contre l'hépatite B et vaccin contre le virus du papillome humain. Ce dernier est utilisé pour prévenir les infections causées par le papillomavirus humain (VPH) dont les génotypes 16 et 18 sont responsables des cancers du col de l'utérus, du vagin, du pénis, de la vulve et de l'anus.[106, 111]

Les messages chimiques envoyés par les cellules cancéreuses afin d'inhiber la réponse immunitaire anti-cancéreuse (notamment par la sécrétion de cytokines inhibitrices de l'immunité IL-10 et TGF β et en diminuant l'expression de MICA qui est nécessaire pour l'activation des NK), la présentation d'antigènes du soi sur la surface des cellules cancéreuses ainsi que les changements génétiques et le développement de mécanismes pour perdre les antigènes propres aux cellules cancéreuses ou non (en diminuant l'expression des HLA classe I et des récepteurs des cellules T, les TCR) sont des facteurs qui bloquent la réponse immunitaire et rendent difficile la mise au point de vaccins anticancéreux. [112, 113]

2.1.7 Tests de dépistage

Des tests de dépistage existent afin de vérifier la présence d'un cancer chez les individus qui ne présentent pas de symptômes. Ces tests permettent de détecter plusieurs cancers précoces, d'accélérer le début des traitements et ainsi d'augmenter les chances de guérisons. Parmi les tests de dépistage, on note la coloscopie et la sigmoïdoscopie pour le cancer du côlon, la tomodensitométrie spiralée (hélicoïdale) basse dose pour le cancer du poumon, la mammographie dans le cas du cancer du sein, et le test Pap et HPV pour le cancer du col de l'utérus, du vagin et du cerveau.[114, 115]

Il est intéressant de noter que de nouvelles technologies sont en développement pour détecter de façon précoce le cancer du sein. Par exemple, un appareil présentement utilisé en Russie et en Malaisie, basé sur les principes de la tomographie électro impédance est en train de se développer pour un dépistage précoce du cancer du sein. En utilisant un appareil nommé "MEIK Device", cette technologie se base sur le principe que chaque type de tissu du sein a un profil différent de conductivité électrique : les tissus cancéreux sont 10 à 60 fois plus conducteurs que d'autres types de tissus. Cette différence de conductivité est détectée par le "MEIK Device" afin de détecter des cellules cancéreuses du sein ayant une taille aussi petite que 3 mm. [116]

2.1.8 Traitements

Les traitements pour les cancers dépendent de plusieurs facteurs comme l'âge, l'état de santé, et le degré d'évolution du cancer. Il n'existe pas un traitement unique pour les individus atteints du cancer; ces derniers reçoivent généralement une combinaison de plusieurs traitements. Parmi les traitements qui existent, on note la chirurgie, radiation, chimiothérapie, l'immunothérapie, la thérapie hormonale et génique.

2.1.8.1 Chirurgies

Les chirurgies sont utilisées comme un moyen pour limiter et arrêter la propagation du cancer dans l'organisme. Ce traitement est seulement efficace dans le cas où le cancer n'a pas encore métastasé. La chirurgie consiste à enlever complètement la tumeur ainsi qu'une partie du tissu sain en périphérie afin d'assurer l'extraction totale des cellules cancéreuses. Cette intervention peut mener à la guérison du patient.

Dans le cas d'un cancer métastatique, les interventions chirurgicales sont limitées vu l'impossibilité de cibler les cellules cancéreuses propagées dans le corps.

2.1.8.2 Chimiothérapie

Développée dans les années 1940, la chimiothérapie est un traitement qui peut être utilisé seul ou en combinaison avec une autre thérapie anticancéreuse. Rappelons que les cellules cancéreuses n'ont pas d'inhibition de croissance par le contact intercellulaire donc elles divisent sans arrêt. La chimiothérapie a pour objectif de bloquer la division et la métastase des cellules cancéreuses. Pour ce faire, le traitement va induire l'apoptose des cellules cancéreuses par l'emploi de substances chimiques interférant avec la mitose cellulaire. Ces substances visent les cellules à division rapide, dont les cellules cancéreuses, et agissent en causant des dommages dans les protéines ou l'ADN cellulaire(s). La chimiothérapie est utilisée dans le cas de cancer métastatique et non métastatique, car elle est administrée par voie systémique et agit sur tout l'organisme. Sachant que la multiplication cellulaire s'observe aussi pour des cellules saines, ces dernières peuvent donc être aussi affectées par le traitement. Divers agents chimiothérapeutiques ont donc un effet toxique sur des tissus comme la moelle épinière et de la muqueuse. Les effets secondaires de la chimiothérapie fréquemment observés incluent la nausée, la perte de cheveux, la fatigue et le vomissement.[117, 118]

2.1.8.3 Radiation

La radiothérapie consiste à l'emploi de rayons gamma élevés en énergie sur la tumeur.[119] Ces rayons sont émis à partir de métaux comme le radium. La source des radiations peut provenir d'un dispositif externe, ou interne (la curiethérapie). La curiethérapie consiste à placer des radio-isotopes tout près de la tumeur et engendre des dommages au niveau de l'ADN des cellules cancéreuses et/ou crée des radicaux libres intracellulaires qui à leur tour, endommagent l'ADN des cellules cancéreuses. Ces dommages moléculaires poussent la cellule en apoptose.[119] Trois types de radioisotopes sont utilisés dans la radiothérapie, dépendamment du cancer en question. Le Radium-223, Strontium-89 et le Samarium-153 sont utilisés dans le cas du cancer secondaire de l'os. L'iode-131 est employée dans le cas du cancer de la thyroïde. [120-122]

Malheureusement, la radiothérapie touche aussi des cellules saines avoisinantes ce qui mène à des effets secondaires. Parmi les effets secondaires les plus courants, on note la fatigue et les troubles du sommeil.[123, 124]

2.1.8.4 Immunothérapie

L'immunothérapie est employée pour stimuler le système immunitaire agissant contre la tumeur. Ce type de traitement anticancéreux a émergé dans les années 1980 lorsque Dre. Alice Yu a testé des anticorps présentement connus sous le nom de ch14.18 pour traiter les neuroblastomes.[125] L'immunothérapie locale consiste à injecter une substance dans la région atteinte afin de causer l'inflammation locale, l'induction du système immunitaire et finalement le rétrécissement ou l'éradication de la tumeur. Dans le cas du cancer de la vessie, une solution contenant du BCG (vaccin bilité de Calmette et Guérin) est injectée par des irrigations locales de la vessie afin de stimuler l'immunité locale.

Contrairement à l'immunothérapie locale, l'immunothérapie systémique ou générale permet de traiter l'entière du corps en injectant par voie générale des interférons recombinants (interféron alpha et gamma), des immunoglobulines (trastuzumab) ou des cytokines (interleukine 2). Les immunoglobulines (anticorps monoclonaux) sont surtout utilisées afin d'inhiber la division des cellules cancéreuses en bloquant les récepteurs codés par des oncogènes. Le trastuzumab, un anticorps monoclonal, est utilisé dans le cas du cancer du sein chez les femmes afin de bloquer le récepteur HER2. Le HER2 est présent en grande quantité, et responsable de la

division incontrôlée des cellules cancéreuses.[126, 127] Dans le cas du cancer du rein métastatique et les mélanomes au stade avancé, l'interleukine 2 est employée afin de stimuler l'activité et la prolifération des lymphocytes et des lymphocytes T tueurs pour détruire les cellules cancéreuses.[128, 129] Les interférons utilisés lors de l'immunothérapie permettent une augmentation des molécules CMH de classes I et II, augmente le nombre des cellules T mémoire, augmentent l'infiltration des cellules T lymphocytaires dans les cellules cancéreuses, activent les cellules T et les NK et assurent la maturité des cellules dendritiques afin d'éliminer les cellules tumorales.[130-132] Il est à noter que l'implant de la moelle épinière fait partie de l'immunothérapie, car les cellules immunitaires du donneur vont attaquer les cellules cancéreuses qui sont présentes chez le receveur.

2.1.8.5 Thérapie génique et hormonale

La présence de gènes surexprimés ou inhibés est responsable de la capacité des cellules cancéreuses à se diviser indéfiniment, à métastaser, à induire l'angiogenèse et à contourner le système immunitaire. La thérapie génique se base sur trois approches : l'introduction d'un gène normal dans les cellules cancéreuses afin de remplacer celui qui est muté, l'induction d'une mutation permettant de silencer un gène muté, et la mise au point de modifications génétiques pour induire l'apoptose chez les cellules cancéreuses. Il a été démontré que les cancers sont fréquemment associés à des protéines p53 mutées qui permettent aux cellules cancéreuses d'éviter l'apoptose. Vu que la fonction de p53 est perdue dans plusieurs types de cancer, il est logique de penser à restaurer la fonction de p53 en introduisant du p53 sauvage ("wild type"). Des recherches en thérapie génique ont été réalisées afin d'introduire le gène p53 de type sauvage dans les cellules cancéreuses et ainsi induire leur apoptose.[133] En fait, Fujiwara T et al. (1993) ont réussi à inhiber la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* en introduisant le gène p53 sauvage dans des cellules humaines cancéreuses du poumon H322a. [134] De plus, dans le but de protéger les cellules souches hématopoïétiques contre les effets toxiques de la chimiothérapie, le gène MDR1 (ayant le rôle d'expulser les chimiodrogues à l'extérieur de la cellule) peut être introduit via des vecteurs rétroviraux dans les cellules souches de la moelle épinière. Cette action permettra de protéger les cellules souches des effets toxiques des chimiodrogues, comme le taxol, utilisées à forte dose lors de la chimiothérapie. En 1992, Sorrentino BP et al. ont réalisé chez des souris une greffe de cellules de moelle épinière transfectées avec le gène MDR1, et ont observé

une résistance des cellules greffées contre le taxol.[135] D'autre part, il existe des protéines (MDR1, HIP1, GPCR, GPR, AGR2, etc.) qui sont surexprimées chez les cellules cancéreuses.[19, 133, 136, 137] L'inhibition des gènes codant pour ces protéines peut freiner la croissance et la division des cellules cancéreuses, l'angiogenèse, la métastase et la résistance à la chimiothérapie. Une des façons permettant d'inhiber des gènes est le silençage génique. Le silençage génique peut être réalisé à l'aide des siARN ("short interfering RNA") et shARN ("short hairpin RNA") permettant un silençage post-transcriptionnel.[138] Montazami et al., en 2015, dans une étude menée sur des cellules humaines cancéreuses du colon (SW480), ont trouvé que l'inhibition du gène MDR1 par le MDR1-siARN. Cette inhibition a permis de partiellement reverser la résistance de ces cellules à l'oxaliplatine.[139] De plus, il a été remarqué que la protéine GPR était fortement exprimée dans les cellules humaines cancéreuses gastriques. En 2013, Zishu et al. ont transfecté des cellules cancéreuses gastriques (AGS et MGC80-3) avec du shARN anti-GPR137. Le silençage du gène GPR137 a abouti à une diminution dans la prolifération des cellules cancéreuses et en une réduction de la formation de colonies tumorales.[140] Aussi, il est bien connu que le gène AGR2 joue un rôle important dans la survie et la croissance cellulaire des cellules cancéreuses du sein en modulant la cycline D1, le récepteur d'œstrogène alpha et la survivine. En 2010, Kathryn E.V. et al. ont silençer le gène AGR2 à l'aide des siARN, chez des cellules cancéreuses du sein (T47 D et ZR-75-1). Le silençage d'AGR2 a été accompagné d'une diminution des taux de cyclin D1, d'une diminution de la croissance cellulaire tumorale et d'une induction de l'apoptose.[141] De plus, la thérapie génique peut être utilisée pour développer des virus (virus "oncolytiques" : ex. Newcastle Disease Virus, des virus génétiquement modifiés visant les cellules cancéreuses, comme le virus de la rougeole, le virus de la stomatite vésiculaire, l'adénovirus, etc.) et des gènes de suicides afin de cibler les cellules cancéreuses. Ces virus croissent sélectivement dans les cellules cancéreuses.[142-144] Dans une étude *in vivo* menée par Salva et al. en 2012, des nanoparticules chitosane/VEGF-siARN ont permis de réduire l'angiogenèse et la croissance du cancer du sein. [145]

En plus de la thérapie génique, on note la présence d'une autre forme de thérapie systémique connue sous le nom de thérapie hormonale. La thérapie hormonale, ou hormonothérapie, est surtout appliquée dans le cas des cancers où les cellules tumorales ont besoin de certaines hormones (comme l'œstrogène ou la progestérone dans le cas du cancer du sein) afin de stimuler leur croissance. Cette thérapie se base sur les médicaments, la chirurgie ou

la radiothérapie afin d'inhiber l'action stimulante des hormones sur les cellules tumorales. Dans le cas du cancer du sein, la thérapie hormonale agira sur le taux d'hormones dans le corps, notamment l'œstrogène et la progestérone, afin d'affecter les cellules cancéreuses qui nécessitent ces hormones pour leur croissance. La thérapie hormonale peut être employée seulement dans le cas où les cellules cancéreuses du sein contiennent à leur surface des récepteurs d'œstrogènes et de progestérone.[146] D'abord, la thérapie hormonale consiste à injecter des modulateurs sélectifs des récepteurs œstrogéniques (SERM). Il s'agit de médicaments anti-œstrogéniques, tel que le Tamoxifène qui empêche l'arrivée de l'œstrogène aux cellules cancéreuses du sein.[147, 148] Ensuite, la thérapie hormonale implique une ovariectomie, une chirurgie pour enlever les ovaires, permettant de bloquer la source principale d'œstrogène chez les femmes.[149] Enfin, dans les cas des femmes qui ne peuvent pas subir de chirurgie, 3 mois de radiothérapie visant les ovaires permettront de diminuer le taux d'œstrogène.

2.1.8.6 La doxorubicine

La doxorubicine est décrite en détail dans cette section, car il s'agit d'une drogue largement exploitée en chimiothérapie et parce qu'elle a été utilisée dans ce projet de recherche pour tester la resensibilisation des cellules cancéreuses. La doxorubicine est un antibiotique cytotoxique d'origine naturelle appartenant à la classe de médicament des anthracyclines. La doxorubicine dérive des bactéries du genre *Streptomyces* et est un composant essentiel de nombreux régimes de traitement pour des tumeurs solides et sanguines. [150, 151] La doxorubicine est généralement considérée comme le seul agent actif disponible pour le traitement du cancer du sein.[152] Cette drogue possède divers modes d'action. Elle agit en s'intercalant dans l'ADN et en inhibant la synthèse de l'ADN et l'ARN.[153]. La force de la doxorubicine réside dans son pouvoir à interagir avec la topoisomérase II- α (TOP2A).[154].

Topoisomérase II alpha (TOP2A) est une enzyme qui contrôle et modifie les états topologiques de l'ADN lors de la transcription. Cette enzyme nucléaire est impliquée dans des processus tels que la condensation des chromosomes, la séparation des chromatides, et le relâchement de la contrainte de torsion qui se produit lors de la transcription et la réplication de l'ADN. Elle catalyse la coupure transitoire et rejoignant des deux brins d'ADN, ce qui permet de modifier la topologie de l'ADN. Le gène codant pour la TOP2A fonctionne comme la cible pour plusieurs agents anticancéreux et une variété de mutations dans ce gène a été associée avec le

développement de la résistance aux médicaments. L'enzyme TOP2A est la cible principale de doxorubicine [154] et ainsi la résistance à la doxorubicine a été corrélée à une réduction de la quantité de TOP2A et de la qualité de son activité. [155-157]

Même si la doxorubicine est utilisée en milieu clinique depuis plus de 40 ans, son mécanisme d'action est toujours en investigation. Des études suggèrent que la doxorubicine interrompt la liaison de la topoisomérase II à l'ADN entraînant ainsi des cassures au niveau de l'ADN.[158] Ceci aboutit à l'échec de la réplication d'ADN et déclenche la mort cellulaire causée par la génération de radicaux libres.[159-162] Il a été aussi décrit que l'induction de l'apoptose cellulaire par la doxorubicine peut être déclenchée par l'inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN et par la formation de réticulations ADN-protéines.[163-165] Un autre mode d'action de la doxorubicine est l'induction de l'expression du ligand Fas induisant ainsi la mort cellulaire par la voie Fas (Fas-mediated apoptosis).[166]. Récemment, Denard et al. (2012) ont trouvé que doxorubicine induisait une augmentation de la production de céramides dans les cellules aboutissant à l'activation de CREB3L1, un facteur de transcription synthétisé comme un précurseur membranaire. La doxorubicine induit le clivage protéolytique de CREB3L. L' amino terminal du CREB3L1 migre dans le noyau puis agit comme un facteur de transcription qui active la transcription de divers gènes codant pour des inhibiteurs du cycle cellulaire, comme la protéine p21. Cette action permet ainsi l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales.[167, 168]

De plus, la doxorubicine permet l'induction de réponses immunitaires anti-tumorales adaptatives [169, 170]. En effet, il a été démontré que cette drogue est impliquée dans la modulation d'une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur en stimulant la production de cytokines, en augmentant l'activité des cellules NK (naturel Killers), en stimulant les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et en augmentant la différenciation des macrophages.[105, 171, 172] Rappelons que l'immunité adaptative nécessite la présentation d'un peptide antigénique aux lymphocytes par les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Lorsqu'une cellule lymphocyte T reconnaît un peptide présenté sur la surface d'une CPA, un premier signal est déclenché. Cependant, un deuxième signal est nécessaire pour l'activation des lymphocytes T. Ce deuxième signal est déclenché par la présence des molécules co-stimulatrices.[173] La balance entre les signaux stimulateurs et inhibiteurs joue un rôle crucial dans la maximisation du pouvoir

du système immunitaire adaptatif à défendre l'organisme, tout en gardant une tolérance et tout en empêchant l'auto-immunité. [174]

B7-H1 (PD-L1, CD274) est une molécule exprimée chez de nombreux types de cancers, et est inhibitrice des lymphocytes T. Cette protéine est exprimée à la surface des cellules CPA (cellules présentatrices d'antigènes) et se lie à son ligand sur les lymphocytes T, aboutissant à une inhibition des cellules lymphocytaires T, et à leur apoptose.[174] La B7-H1 permet ainsi aux cellules cancéreuses d'échapper au système immunitaire. Parmi les chimiodrogues testées *in vitro*, la doxorubicine s'est avéré comme le plus efficace inhibiteur de l'expression, à la surface cellulaire, de la protéine B7-H1.[175] Les résultats obtenus *in vitro* ont été validés *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de souris, ainsi que dans le tissu cardiaque de souris connu pour exprimer constitutivement B7-H1.[175] Le traitement des cellules cancéreuses du sein avec la doxorubicine entraîne une diminution de l'expression de B7-H1 à la surface cellulaire, une augmentation de son expression nucléaire et ainsi mène à l'apoptose. [176] Cette redistribution de B7-H1 a été accompagnée d'une translocation au noyau d'une MAP kinase, la protéine AKT phosphorylée. La protéine AKT, activée par la phosphorylation est impliquée dans plusieurs processus cellulaires, dont l'apoptose. L'inhibition de la voie de signalisation d'AKT engendre une diminution de l'expression membranaire de la protéine B7-H1 et une augmentation de son expression nucléaire, suggérant l'implication de la voie AKT dans la relocalisation de la protéine B7-H1 dans le noyau.[175]

La doxorubicine est considérée comme l'agent le plus efficace dans le traitement du cancer du sein, à la fois en tant que monothérapie ainsi qu'en association avec d'autres médicaments. [177] Cependant, l'usage répétitif de cette molécule peut augmenter dangereusement les risques que des cellules cancéreuses du sein à développer une résistance aux médicaments. De nombreux mécanismes moléculaires contribuent au développement de la résistance à la doxorubicine et différents cancers peuvent exprimer différents gènes de résistance aux médicaments.

Bien que le cancer du sein soit causé par des tumeurs solides chimiosensibles, la plupart des patients développent une résistance à un large éventail de médicaments. Par conséquent, le cancer du sein qui est réfractaire aux médicaments cytotoxiques est généralement incurable. [178] Un taux 43% des patients traités pour la première fois avec la doxorubicine ont montré une

réponse positive à ce traitement, alors que seulement 28% des patients déjà exposés à cette drogue ont montré une réponse positive au traitement répété. [179]. Il y a donc une résistance croissante à la doxorubicine qui est une cause majeure de l'échec du traitement [180]

2.1.9 Les cellules MCF-7

Pour étudier l'efficacité de nouveaux traitements contre le cancer du sein, les chercheurs devaient obligatoirement trouver des modèles cellulaires adéquats. Les cellules MCF-7 sont des cellules épithéliales tumorales mammaires qui ont été isolées en 1970, à partir de France Mallon, une femme de race blanche âgée de soixante-neuf ans souffrant d'un cancer du sein métastatique. Les cellules MCF-7 sont devenues le modèle standard dans des centaines de laboratoires dans le monde pour les études menées sur le cancer du sein.[181-184] En 1973, à l'institut de Detroit, Herbert Soule et collègues ont établi la lignée MCF-7 après sept essais. Ainsi MCF-7 est l'acronyme de "Michigan Cancer Foundation-7", maintenant connue sous le nom de Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, l'institut où la lignée MCF-7 fut établie. [185]

Les MCF-7 sont des cellules qui expriment les antigènes d'un groupe sanguin O, rhésus positif (Rh^+), possèdent des récepteurs d'œstrogène, et expriment l'oncogène WNT7B ainsi que l'insuline growth factor binding protein" type 2 (IGFBP-2), 4 (IGFBP-4) et 5 (IGFBP-5). Les IGFBP jouent le rôle de protéines qui vont transporter les "Insuline growth factors" afin d'allonger leur demi-vie dans les tissus.

Les cellules MCF-7 sont d'un grand intérêt parce qu'elles peuvent devenir résistantes aux drogues telles que la cyclophosphamide, la doxorubicine, l'épirubicine et le méthotrexate. [11] On appelle MCF-7 MDR les cellules MCF-7 ayant développé une résistance multiple aux drogues.

2.1.10 Phénomène de résistance aux drogues

L'acquisition d'une résistance aux drogues, suite à une exposition répétée, nuit sérieusement à l'efficacité des traitements. Les cellules MDR "Multi-drug resistant" sont des cellules résistantes à différentes drogues anticancéreuses.

Deux formes de résistance à la chimiothérapie ont été décrites: résistance intrinsèque et acquise. La résistance intrinsèque est une résistance préexistante qui est présente avant

l'exposition à un médicament donné. En revanche, la résistance acquise se développe chez les cellules tumorales qui étaient initialement sensibles au médicament, mais qui deviennent résistantes à ce dernier avec le temps. [186] La résistance aux médicaments est une caractéristique du cancer. Les mutations somatiques et de la plasticité génomique associées au cancer sont le fondement de la résistance aux médicaments.[187] Par conséquent, l'hétérogénéité du cancer est expliquée par le fait que chaque type de cancer exprime un ensemble de gènes de résistance différents aux médicaments. De plus, même les cellules faisant partie du même type de cancer peuvent présenter une énorme quantité d'hétérogénéité à l'égard de la résistance aux médicaments. [188]

2.1.10.1 Cause de résistance aux drogues

De nombreux mécanismes peuvent travailler simultanément afin de protéger les cellules cancéreuses des agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine. [189] Les changements moléculaires qui sont accompagnés par la résistance à la doxorubicine se caractérisent par une diminution de la concentration intracellulaire des chimiodrogues, due à l'expression d'un grand nombre de pompes d'efflux dans la membrane, [190] à l'augmentation des enzymes métabolisant les médicaments tels que le glutathion-S-transférase GST, [13] à la diminution de la concentration et de l'activité de la TOP2A, [191] et à l'échec des voies de l'apoptose cellulaires. [192]

Parmi la famille des enzymes cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de plusieurs médicaments, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C19, CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4 et CYP3A5 sont surexprimées chez les cellules résistantes à la doxorubicine, ce qui induit la désactivation de la doxorubicine et augmente ainsi les chances de survie cellulaire. [193, 194] De plus, une surexpression du gène GSTP1 a également été observée dans les cellules résistantes à la doxorubicine. GSTP1 catalyse la conjugaison du glutathion à une grande variété de médicaments, ce qui les rend plus solubles dans l'eau, facilitant ainsi leur élimination de la cellule. [195]

Parmi les voies apoptotiques altérées caractéristiques d'un cancer, on note la surexpression du gène BCL2 codant pour une protéine anti-apoptotique qui joue un rôle important dans la survie cellulaire, et qui, dans le cas du cancer du sein, joue un rôle dans la résistance à la doxorubicine. [196] En plus de la surexpression du gène BCL2, des études ont montré que les cellules cancéreuses résistantes à la doxorubicine inhibent le gène GSK3 ("glycogen synthase kinase-3"),

qui code pour une protéine qui retarde la voie de signalisation apoptotique. Elle est aussi impliquée dans la résistance à d'autres agents chimiothérapeutiques, tels que la camptothécine et l'étoposide. [197]

2.1.10.2 Internalisation cellulaire des drogues

Afin de bien comprendre le phénomène de résistance aux drogues, il est important d'étudier les mécanismes d'entrée des drogues dans les cellules cancéreuses. Les mécanismes d'entrée varient en fonction de la nature hydrophile ou hydrophobe de la molécule anti-cancer.

Les molécules hydrophiles, solubles dans l'eau, sont incapables de passer à travers la membrane cellulaire hydrophobe. Leur internalisation dans la cellule nécessite des transporteurs qui permettent leur entrée par des canaux hydrophiles se situant au niveau transmembranaire. Une mutation des transporteurs entraîne une baisse dans l'accumulation des drogues à l'intérieur de la cellule aboutissant ainsi à une résistance de la cellule contre une drogue spécifiquement.

Les molécules hydrophobes, insolubles dans l'eau, comme la doxorubicine, passent à travers la membrane plasmique par diffusion passive sans l'aide des transporteurs.[198, 199]

2.1.10.3 Transport extracellulaire des drogues

Il est possible d'éviter l'accumulation des drogues dans les cellules par l'activation des systèmes de transport dépendant de l'énergie. Faisant partie de ces systèmes, le premier à être identifié parmi les transporteurs "ATP-binding dependant cassette" (ABC), est la protéine P-gp. Au total 48 différents transporteurs ABC, divisés en sept groupes (de A à G), ont été identifiés dans le génome humain. Parmi ces sept groupes, trois (B, C et G) sont impliqués dans la résistance aux drogues.[200, 201] La protéine P-gp, exprimée dans un nombre limité de tissus, est impliquée dans le transport des composés neutres et hydrophobes, et dans la résistance de divers cancers à la chimiothérapie. [202] Elle contient plusieurs sites de liaison de substrat au sein du domaine de liaison de ligand, [203, 204] et est directement responsable de l'exportation des xénobiotiques contenus dans les cellules vers l'espace extracellulaire. Des expériences menées par Schinkel AH et al. (1997) et Johnson DR et al. (2001) sur des souris transgéniques ont prouvé que le gène MDR1 codant pour la P-gp est impliqué dans l'absorption des drogues, leur élimination, et joue un rôle important dans les voies de détoxification. [205, 206]

2.1.10.4 Preuves cliniques d'expression des transporteurs ABC dans les cellules cancéreuses

Cinq critères doivent être respectés pour prouver l'implication des transporteurs ABC dans la résistance des cellules cancéreuses contre les drogues anti-cancers. Premièrement, le niveau d'expression des transporteurs doit prédire le degré de résistance aux drogues. Deuxièmement, l'utilisation d'inhibiteurs de transporteurs, faisant partie de la chimiothérapie, doit donner un avantage de survie. Troisièmement, le cancer doit exprimer le transporteur à des niveaux déjà prouvés *in vitro* à conférer une résistance aux drogues en question. Quatrièmement, durant le traitement anticancéreux, le développement de la résistance aux drogues doit être accompagné d'une augmentation de l'expression du transporteur. Finalement, les substances qui inhibent la fonction du transporteur doivent inverser la résistance aux drogues.[202]

Plusieurs études ont montré l'implication de MDR1 dans la résistance aux drogues. En effet, il s'est avéré que MDR1 est exprimé chez 1/3 des patients souffrant de leucémie aiguë myéloblastique (AML) durant leur premier diagnostic et chez plus que 50% des patients lors de leur première rechute. De plus, List et al. en 2001, ont montré que l'emploi de cyclosporine A (un inhibiteur de P-gp) pour le traitement de l'AML améliore les chances de rémission et améliore la survie.[207] Ainsi, pour l'AML, tous les critères indiquant que MDR1 est impliqué dans la résistance des cellules cancéreuses aux drogues ont été vérifiés.

2.1.10.5 Protéine P-gp

Rappelons que parmi les différentes pompes d'efflux ATP-dépendante impliquées dans la résistance des cellules aux chimiodrogues, la protéine P-glycoprotéine (P-gp) était la première à être identifiée.[208] Dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinales, les reins, le foie, le cerveau, les ovaires et les testicules, la protéine P-gp bloque l'entrée des xénobiotiques et entraîne leur excrétion dans la bile et l'urine.[209] La protéine P-gp, localisée sur le chromosome 7q21 appartient à la famille des protéines "ATP-binding cassette" (ABC). Cette protéine humaine a une masse moléculaire de 170 KDa et est formée de 1280 acides aminés.[210, 211]. Les analyses de la séquence de la protéine P-gp révèlent deux domaines transmembranaires, chacun formé de six domaines transmembranaires et deux domaines de liaisons aux nucléotides (**Figure 2.1**). La reconnaissance des drogues par la protéine P-gp est assurée par les domaines transmembranaires. Les polymorphismes dans le gène MDR1 codant pour la protéine P-gp,

affectent les propriétés pharmacocinétiques des drogues utilisées pour le traitement des cancers. [202]

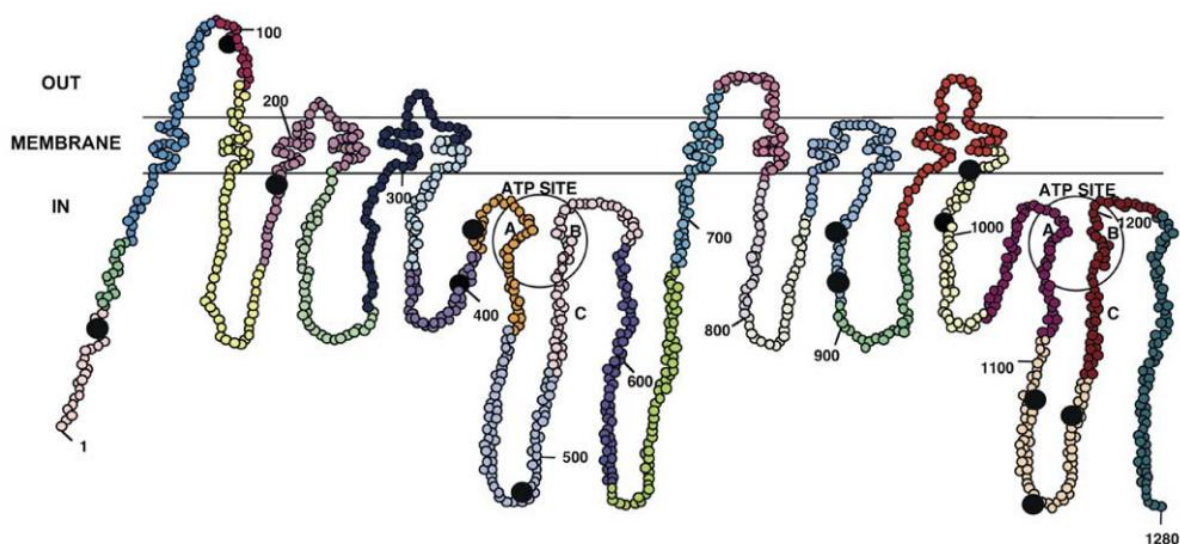


Figure 2.1 Structure 2-D de la protéine P-glycoprotéine (P-gp) [202]

2.1.10.5.1 Polymorphisme du gène *MDR1*

Diverses études ont été menées pour étudier les fonctions pharmacologiques du gène *MDR1* pour caractériser la protéine P-gp. Des études *in vitro* et *in vivo* ont prouvé que cette protéine joue un rôle important dans l'absorption, distribution, métabolisme et excrétion d'une grande variété de médicaments anticancéreux.[212] Diverses études pharmacogénétiques et pharmacogénomiques de la protéine P-gp ont relié l'altération dans son expression et fonctionnement à des substitutions d'un seul nucléotide (SNP) dans la région codante du gène *MDR1*. [213-215] Dans les dernières années, un total de 50 SNP a été documenté dans le gène *MDR1*. [216] Parmi les SNP identifiées résultants en des changements au niveau des acides aminés, certains codent pour des acides aminés qui sont proches du site de liaison de l'ATP (exemple G1199A dans l'exon 11), et d'autres sont localisés dans les domaines transmembranaires de la protéine P-gp (exemple G2956A dans l'exon 24). [217] Il est important d'étudier les SNP du gène *MDR1* pour mieux comprendre l'effet des SNP sur la fonction de la protéine P-gp dans les cancers et pour prédire la sensibilité d'un individu aux drogues qui sont des substrats de la protéine P-gp. [218]

Rappelons que le développement d'une résistance des cellules cancéreuses aux médicaments est associé à une surexpression de la protéine P-gp codée par le gène MDR1. Ainsi une réduction de l'expression de ce gène pourrait rendre les cellules cancéreuses plus sensibles à la chimiothérapie

2.2 ARN interférent

La technologie basée sur l'utilisation des ARN interférents (ARNi), est une stratégie forte intéressante pour le traitement de maladies causées par la surexpression de certains gènes. La découverte des ARN interférents a été une avance importante dans le domaine de la biologie moléculaire.

Les ARNi ont été utilisés pour réduire l'expression d'une multitude de gènes, dont le gène MDR1 aussi nommé ABCB1 et codant pour la protéine P-gp.[3, 37, 219-221]

2.2.1 Historique de l'ARN interférent

L'effet de l'ARNi a été observé pour la première fois en 1990 par un groupe de chercheurs qui désiraient augmenter l'intensité de la teinte mauve des petunias à des fins commerciales. Dans le but de surexprimer le gène chalcone synthase (CHS), responsable de la pigmentation des petunias, l'équipe de Richard Jorgensen a introduit le transgène CHS dans les plantes. Contre toute attente, ils ont plutôt observé un blanchiment des petunias. À l'époque, on a attribué le terme de co-suppression à cette forme de silençage post-transcriptionnel chez les eucaryotes. Lors de l'introduction d'un transgène CHS, au lieu d'observer une surexpression du CHS chez l'hôte, on observe une dégradation des ARNm-CHS codant pour la protéine responsable de la pigmentation. Ceci aboutit à la perte de la pigmentation de la plante. Les niveaux du CHS endogène, ainsi que celui qui a été introduit, étaient 50 fois inférieurs à ceux dans les petunias de type sauvage, ce qui leur a permis de penser que le transgène introduit avait un effet co-suppresseur sur le CHS endogène. [222-224]

Plus tard en 1998, Andy Fire et Craig Mello ont démontré pour la première fois que l'injection de l'ARN double brins (ARNdb) dans *C. elegans* mène au silençage spécifique d'un gène. Leurs résultats ont aussi démontré que les ARN double brins sont des ARN interférents plus efficaces que les ARN simple brin déjà utilisés. Leur travaux sur les ARN interférents ont été récompensés

par un prix Nobel (médecine et physiologie) en 2006.[225] Fire et Mello, en 1998, ont proposé que cette interférence résulte d'un mécanisme antisens simple qui dépend de l'hybridation spécifique entre l'ARN injecté et les ARNm endogènes transcript.[226] Un an plus tard, Hamilton AJ et Baulcombe DC démontrèrent que des petits ARN antisenses étaient impliqués dans le silençage post-transcriptionnel de gènes dans la plante.[227] En utilisant la drosophile en système *in vitro*, Zamore et al, ont rapporté en 2000 que les longs ARN doubles brins étaient modifiés par une ARNase III, appelée Dicer, en de petits fragments de 21-23 nt.[228] Ils suggèrent aussi que ces fragments guidaient le clivage de l'ARNm.

Cependant, en 2000, Esteban et son équipe ont démontré que le silençage impliquant de longues chaînes d'ARN (ARNdb) n'est pas spécifique au gène visé. Ceci mène à une réduction des quantités totales d'ARNm. Cette baisse cause une apoptose déclenchée par l'activation de l'interféron via une kinase dsRNA-dépendante. [229] C'est ainsi qu'en 2001, Tuschli et ses collègues ont démontré que le problème de cette réponse non spécifique des dsRNA peut être résolu par l'emploi de séquences synthétisées de 19-23 nucléotides : les siARN "small interfering RNA".[219] C'était la première description de l'ARN interférents dans les cellules de mammifères. Ainsi les petits fragments d'ARN double brin (siRNA) inhiberaient rapidement, efficacement et spécifiquement l'expression des gènes dans des cellules humaines. En 2002, il a été démontré par Paddison PJ et al., Sui G et al. et Paul CP et al. que les shARN "Short hairpin RNAs" induisent le silençage spécifique dans les cellules de mammifères.[230-232] Davis et al., en 2010, ont démontré pour la première fois que l'administration systémique de siARN aux humains peut mener à une inhibition spécifique d'un gène (réduction de l'ARNm et de la protéine) par un mécanisme d'action de l'ARN d'interférence.[233]

2.2.2 Mécanisme d'action des siARN

Les siARN, sont des duplexes d'environ 21-23 nucléotides d'ARN doubles brins qui peuvent entraîner le silençage de l'expression d'un gène de façon spécifique. Les siRNA peuvent provenir d'une longue molécule précurseur d'ARN, exprimée de façon endogène tel que les micros ARN (miARN) ou d'une provenance extérieure telle que les petits ARN en épingle à cheveux (shRNA) transcrits à partir de plasmides d'ADN introduit dans la cellule.[3]

L'inhibition induite par les siARN, connue sous le nom de silençage post-transcriptionnel, suit un mécanisme bien spécifique. Le mécanisme moléculaire du silençage par le siARN a été

élucidé suite à des analyses impliquant la *Drosophila melanogaster*, aussi appelée la mouche du vinaigre.[234] Les longues chaînes des dsRNA "double-stranded RNA" sont clivées par un "Dicer" (membre de la famille des RNase III) pour former des fragments de 19 à 23 nucléotides. Les fragments ainsi obtenus sont nommés des siARN "small interference RNA". Ces fragments doubles brins sont formés d'un brin guide et d'un brin passager. La séparation des deux brins du duplexe siARN se fait par l'endonucléase Argonaute 2 (Argo2). C'est alors que le brin guide s'incorpore dans le complexe RISC "RNA interference Specificity Complexe". [235]

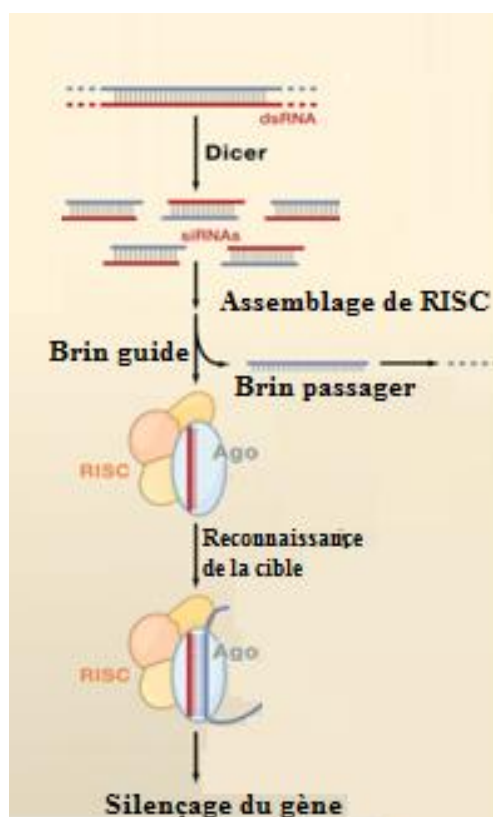


Figure 2.2 Mécanisme de silençage génique. Image inspirée de l'article écrit par Richard W. Carthew et al. en 2010.[236]

Le brin guide reconnaît la séquence complémentaire de l'ARNm et dirige le complexe RISC pour induire la dégradation de l'ARNm. C'est le domaine PIWI de Ago 2 et le "dicer" qui sont responsables de la dégradation de l'ARNm (**Figure 2.2**).[237, 238]. Ce clivage génère, en premier lieu, des fragments avec des terminaisons 5'-monophosphate et 3'-hydroxyl et va permettre, en deuxième lieu, aux exonucléases cellulaires d'attaquer ces fragments pour

compléter le processus de dégradation. [239, 240] Une fois que le clivage est produit, le complexe va se dissocier du brin guide (antisens) du siARN permettant au complexe RISC d'aller attaquer d'autre ARNm cible. [241] Il est à noter que même dans le cas où il n'y a pas une complémentarité parfaite entre le siARN et l'ARNm, un silençage post-transcriptionnel peut être observé.

2.2.3 Les défis de l'utilisation des siARN en milieu clinique

L'utilisation des siARN pour inhiber l'expression d'un gène relève plusieurs défis, dont la stabilité du siARN, la livraison spécifique au tissu cible et l'identification de la séquence de l'ARNm à cibler pour obtenir un le silençage efficace.

2.2.3.1 Stabilité des siARN

Afin d'assurer la stabilité des siARN, deux types de siARN ont été développées: des siARN chimiquement synthétisés et des siARN générés par digestion enzymatique. [242] Les siARN chimiquement synthétisés sont préparés avec une composition uniforme, en large quantité et avec un plus grand intervalle de modification chimique que les siARN générés par digestion enzymatique. Leurs désavantages majeurs sont le coût élevé de fabrication et le temps important de synthèse. [243, 244]

2.2.3.2 La séquence ciblée par les siARN

L'efficacité de silençage varie avec les segments de l'ARNm visés. Il est suggéré que la région visée doit être d'au moins 70 à 100 nucléotides en aval du site de traduction de l'ARNm et que les rapports de quantité des AU:GC soient à 50%. [245] Cependant, le choix des siARN en fonction de ces informations ne permet pas de définir et de viser la séquence du gène qui mène à un silençage optimal. C'est pour cette raison qu'une technique de formation des siARN par digestion enzymatique a été mise en point. La première étape consiste à amplifier les séquences nucléiques et puis la transcription par la T7 ARN polymérase. L'ADNase sera par la suite ajoutée pour digérer les séquences d'ADN se trouvant dans le milieu. À la fin de ces étapes, de longues chaînes double-brins d'ARN seront générées. Ensuite, les siARN seront générés en digérant, par la RNase III (source: *E.coli.*) ou par une autre enzyme nommée "Dicer", les fragments obtenus. C'est une méthode rapide à réaliser, à faible coût et semblable à la réaction endogène. [246] Dans

le cytoplasme des cellules des mammifères, "dicer" initie la réaction de silençage d'un gène en cassant les longues chaînes des dsRNA pour donner de courtes chaînes (21-23 nucléotides) d'ARN nommées siARN.[39]

2.2.3.3 Livraison des siARN

Un nouvel espoir pour le traitement des maladies incurables et des maladies génétiques a émergé avec la découverte des siARN. [247] Toutefois la livraison des siARN dans les cellules ciblées constitue un des obstacles majeurs à leur utilisation comme traitement clinique. Les siARN nus sont instables dans le sang et le sérum et ont une courte demi-vie *in vivo*. Leurs importantes charge négative et poids moléculaire (~13 kDa) les empêchent de traverser la double membrane cellulaire et entraînent leur dégradation par les nucléases, avant leur internalisation dans la cellule.[248] Ces facteurs réduisent rapidement leur efficacité thérapeutique. Ainsi l'usage de vecteurs viraux, tels que les rétrovirus et les adénovirus modifiés, s'est avéré beaucoup plus efficace, mais engendre des préoccupations au niveau de la sécurité, des limitations au niveau de la production des vecteurs viraux en grandes quantités, la toxicité, l'immunogénicité et les interactions non spécifiques avec d'autres tissus.[249, 250] En effet, le problème principal de la transfection par les rétrovirus et les adénovirus modifiés est le risque de mutations insertionnelles. Ceci pourra résulter en l'activation des proto-oncogènes ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui pourra mener à l'apparition de cancers.[251]

Afin de contourner les inconvénients associés aux méthodes virales, les chercheurs ont travaillé à l'élaboration de systèmes de livraison non-viraux. Les systèmes non-viraux présentent plusieurs avantages par rapport aux systèmes viraux comme la faible immunogénicité, la facilité de production et la possibilité d'une production à large échelle.[252] Deux types de systèmes de livraisons non-viraux sont couramment utilisés pour acheminer les acides nucléiques dans les cellules : la livraison à base de lipide et celle à base de polymère.[253-255] La première consiste à couvrir les acides nucléiques par des lipides (DOTIM/cholestérol par exemple) ayant des structures organisées en liposomes ou en micelles pour former des complexes nommées lipoplexes.[255] La deuxième se base sur la formation de complexes de polymères (cationiques par exemple) avec les acides nucléiques pour former des structures nommées polyplexes.[254] PEI (polyéthylénimine) et le chitosane furent parmi les polymères cationiques les plus utilisés grâce à leur efficacité de transfection élevée. PEI empêche la dégradation de l'ADN dans le compartiment endosomal pendant la maturation de l'endosome en lysosome.[253] Cependant, il a

été remarqué que PEI a été associé avec une cytotoxicité importante. [253] Autrefois, le chitosane présentait une faible stabilité par rapport à la plupart des vecteurs non-viraux. Cependant, les récents progrès technologiques dans la modification chimique du chitosane ont permis d'améliorer l'efficacité de transfection du chitosane sans modifier sa biocompatibilité et biodégradabilité. L'usage du chitosane constitue ainsi un système de livraison qui peut être non-immunogènes, non toxiques, produits en grande quantité, et pouvant se lier et condenser une quantité importante d'ADN ou d'ARN (siARN). [256] Le principal inconvénient de l'usage des vecteurs non-viraux est leur faible efficacité de transfection. [257, 258] La formation de complexes chitosane- siARN permet la condensation des acides nucléiques en nanoparticules afin de faciliter leur internalisation intracellulaire par endocytose. Ceci a lieu par des interactions entre la charge négative de la membrane cellulaire et la charge positive des nanoparticules chitosane-siARN. Ainsi l'emploi du chitosane comme véhicule de transport s'avère fort intéressant comme il offre une protection des siARN contre les nucléases, ce qui augmente leur temps de circulation dans le sang, diminue leur clairance rénale et augmente ainsi leur biodistribution. La livraison sécuritaire des siARN à l'intérieur de la cellule (par endocytose) va ainsi leur permettre de s'échapper des endosomes, de se libérer dans le cytosol de la cellule pour ainsi permettre la formation du complexe RISC et donc la destruction de l'ARNm ciblé.

2.2.4 Détermination de l'efficacité des siARN à l'aide de gènes de référence (housekeeping genes)

La méthode de quantification relative par qPCR est largement utilisée afin d'évaluer l'efficacité des siARN à réduire l'expression d'un gène ciblé. Cette quantification permet d'évaluer l'effet des siARN sur la variation du nombre de copies d'ARNm ciblé. Toutefois, cette technique nécessite une comparaison avec des gènes de références ayant une expression stable malgré le traitement avec les siARN.

Les gènes de référence, "housekeeping genes", sont des gènes impliqués dans le maintien des fonctions cellulaires de base permettant aux cellules de vivre. Ces fonctions sont indépendantes du rôle que la cellule joue dans un organisme ou un tissu. Dans des conditions normales et peu important l'état du cycle cellulaire ou les signaux externes que les cellules reçoivent, les gènes de référence sont exprimés de la même manière dans tous les types cellulaires.[259] Vu que les gènes de références ont des niveaux d'expression constants, ils sont

utilisés dans les études expérimentales comme contrôles internes ou endogènes afin de détecter un changement dans l'expression d'un gène en question par exemple. Des études ont été réalisées afin de caractériser ces gènes de référence, et ont montré que ces derniers possèdent plus de répétitions de séquences simples "simple sequence repeats" dans la région 5' non traduite (UTR), ont de courts introns et des exons, ainsi qu'une conservation plus faible de la séquence du promoteur.[260-262] Parmi les gènes de référence fréquemment utilisés comme contrôles endogènes, on note le GAPDH ("glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase"), les tubulines, la cyclophiline, l'albumine, les actines (dont l'ACTB), les ARN ribosomiaux 18S et 28S, la bêta-2-microglobuline (B2M), la phosphoribosyltransférase hypoxanthine-guanine (HPRT), POLR2A, la Pumilio RNA-Binding Family Member 1 (PUM1), le récepteur de transferrine (TFRC), la TATA-binding protein (TBP), le facteur d'élongation 1-alpha (ELF1a) et la porphobilinogène déaminase (PBGD).

2.3 Chitine et chitosane

La chitine est un polymère appartenant au groupe des polymères naturels les plus abondants. C'est un polymère linéaire extrait des carapaces des crustacés (surtout les crevettes et crabes). Cette macromolécule est composée des N-acétyl-D-glucosamine liées entre elles par des liaisons β (1 \rightarrow 4). La structure de la chitine est présentée dans la **Figure 2.3**. [263]

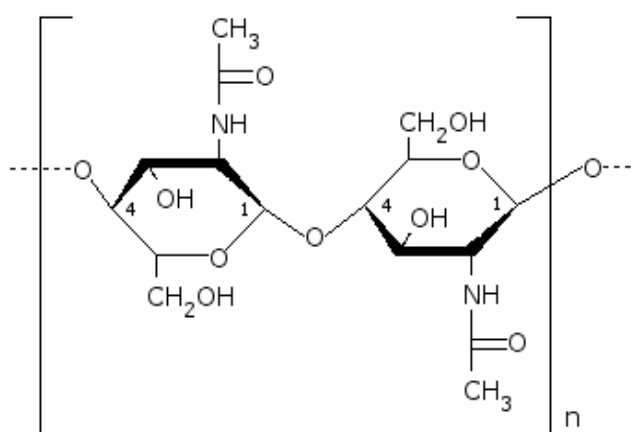


Figure 2.3 Structure de la chitine

Parmi les biomatériaux en voie de développement, le chitosane, un polysaccharide hydrophile, est devenu l'un des centres d'intérêt pour plusieurs scientifiques depuis les deux dernières décennies. Il est surtout utilisé dans les domaines biomédicaux, pharmaceutiques et du génie tissulaire en raison de sa biocompatibilité, sa non-toxicité et sa biodégradabilité. Le chitosane est obtenu par désacétylation alcaline de la chitine pour ainsi transformer les groupements acétyles en amines (**Figure 2.4**). Cette désacétylation se fait en utilisant l'hydroxyde de sodium comme réactif en excès et l'eau comme solvant.

Le chitosane a de nombreuses applications. Il peut être utilisé comme système de livraison de médicaments et de substances pharmaceutiques, il peut aussi servir pour le revêtement des objets des valves cardiaques, pour l'accélération de la cicatrisation des plaies, pour la fabrication des peaux artificielles, pour la formation des hydrogels et pour la livraison d'ADN, ARN ou de protéine dans des cellules.[201, 264-269]

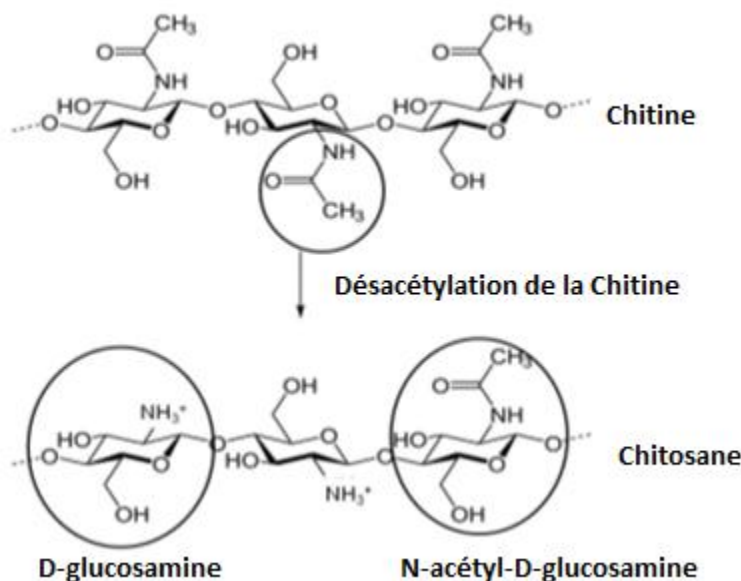


Figure 2.4 Production du chitosane par désacétylation de la chitine (modifié de NEUROtiker 2008)

2.3.1 Utilisation du chitosane comme système de livraison des acides nucléiques

Notre équipe de recherche s'est particulièrement intéressée à l'utilisation du chitosane comme système de livraison d'ADN et de siARN.[270-272] La mise au point de ce système permettra l'application de thérapie génique pour le traitement de diverses maladies telles que le diabète de type 2, l'athérosclérose, arthrite rhumatoïde etc.[44] Le chitosane est une macromolécule qui est biocompatible, biodégradable, non-toxique et chimiquement versatile.[273-275] Il a été démontré par notre groupe de recherche que la modification du degré de désacétylation (DDA) ainsi que la masse moléculaire (Mn) du chitosane et le ratio N :P (ratio groupements amines du chitosane : groupement phosphate des acides nucléiques) influence l'efficacité de la transfection cellulaire avec des plasmides ADN.[48] La possibilité de varier le DDA, Mn et ratio N:P du chitosane s'avèrent donc fort intéressante pour modifier les caractéristiques du système de livraison d'ADN en fonction des besoins et de l'application thérapeutique. En effet, un chitosane ayant une formulation DDA élevé et Mn faible est utilisé dans le domaine de la thérapie génique vu qu'il n'active pas le système immunitaire, tandis qu'un chitosane ayant un DDA faible et une Mn élevée active la réponse immunitaire et pourra ainsi être utilisé pour le développement de vaccins.[47]

Il a été prouvé que le niveau de transfection est en relation directe avec la masse moléculaire du chitosane: pour un degré de désacétylation spécifique (entre 70 et 100%), le chitosane de masse moléculaire comprise entre 10 et 150 kDa présente une efficacité de transfection élevée [276, 277], mais va retarder la libération de l'ADN une fois que les complexes chitosane-ADN ont transfecté la cellule.[278] Ainsi, un chitosane avec un faible Mn doit détenir un DDA assez important, et un chitosane avec un faible DDA doit avoir une grande masse moléculaire afin de bien condenser les siARN.[277] Une formulation avec un ratio N:P élevé, grâce à la présence de chitosane en excès, augmente la stabilité des nanoparticules chitosane-siARN, favorise l'internalisation des complexes dans l'espace intracellulaire et protège les ADN contre la digestion par les nucléases dans les endolysosomes. [279]

La masse moléculaire, le degré de désacétylation et le ratio N:P peuvent affecter les forces électrostatiques entre le chitosane et le siARN.[280] Plusieurs études ont montré l'effet des différentes formulations des nanoparticules chitosane-siARN sur l'efficacité de la transfection. Il

a été démontré qu'un chitosane ayant des DDA et Mn élevés est favorable pour la formation de nanoparticules petites et condensées.[279] Un chitosane ayant un Mn élevé possède une longue et flexible chaîne et un DDA important augmente la stabilité des complexes formés. Le DDA élevé renforce l'interaction électrostatique du chitosane avec le siARN ce qui réduit donc la taille des complexes de façon synergique et augmente alors leur stabilité. [279, 281-283] De plus, un ratio N:P élevé permet l'obtention de nanoparticules plus stables et une protection des siARN contre la dégradation.[279]

2.3.1.1 Nanoparticules chitosane-ADN

Le chitosane a été utilisé dans de nombreuses études pour livrer, *in vivo*, l'ADN d'intérêt dans les cellules ciblées. Les recherches qui ont été menées pendant les dix dernières années ont rendu possible l'utilisation des nanoparticules chitosane/ADN pour une livraison efficace de l'ADN aux surfaces muqueuses par voie orale.[284-286] Chen et al. (2004) ont nourri des souris avec le plasmide pCMV β , contenant le gène lacZ, couplé ou non avec du chitosane. Il a été démontré par cette étude que les nanoparticules chitosane/ADN assurent une livraison efficace du gène dans les entérocytes.[285] Il a été aussi démontré que les nanoparticules chitosane/ADN peuvent être utilisées pour la vaccination. En effet, Khatri et al. (2008) ont administré, par voie nasale, des nanoparticules chitosane/ADN dont l'ADN code pour des protéines de surface du virus de l'hépatite B. Il a été observé que ces nanoparticules administrées à des souris ont mené à la production d'anticorps anti-HBsAg dans le sérum.[286] Yang et al. (2010) ont trouvé que la livraison des nanoparticules chitosane/ADN codant pour la protéine GFP *in utero* mène à une expression génique postnatale. [287] De plus, suite à une administration orale des nanoparticules chitosane/ β -gal chez les souris, Kai et al. (2004) ont démontré une expression du gène β -gal dans le duodénum, colon, jéjunum et l'iléon.[288] Ces résultats montrent le pouvoir du chitosane à traverser la barrière intestinale afin de retrouver la circulation sanguine ou lymphatique. En 2009, Jean et al. ont administré des nanoparticules chitosane/FGF2 et chitosane/PDGF-BB par injection intramusculaire et sous-cutanée. Une expression de ces gènes a été obtenue dans le muscle et les tissus environnants.[47] Mandke et al. (2012) ont injecté dans le muscle tibial antérieur (injection intramusculaire) des nanoparticules chitosane/ADNp codant pour l'interleukine 10 et l'interleukine 4.[289] Une expression prolongée de ces deux interleukines (allant jusqu'à 1 semaine post-injection) a été obtenue.

2.3.1.2 Nanoparticules chitosane-siARN

Un certain nombre de travaux rapportent l'utilisation réussie du chitosane pour livrer des siARN thérapeutiques *in vitro* et *in vivo* dans le domaine du cancer, de l'arthrite rhumatoïde, des maladies infectieuses, etc. Dans le domaine du cancer, l'application des nanoparticules chitosane/siARN dans la thérapie génique fut présentée par Salva et al. en 2012. Salva et al. ont utilisé les nanoparticules chitosane (75-85, 75)/VEGF-siARN dans un modèle *in vivo* de rat présentant le cancer du sein. Les nanoparticules utilisées ont permis une réduction importante dans l'expression du gène VEGF et dans le volume de la tumeur.[290] Les mêmes résultats ont été obtenus par Lee et al. en 2012.[291] Ces derniers ont injecté des nanoparticules chitosane/VEGF-poly-siARN/glycol intraveineusement dans un modèle murin de xénogreffe de cancer de prostate.[291] Kim et al., en 2011, ont observé une augmentation dans l'apoptose des cellules tumorales et une diminution de la prolifération tumorale et dans l'angiogenèse suite à l'injection intraveineuse des nanoparticules chitosane/Src-siARN chez des souris nudes présentant le cancer des ovaires. [292] En 2011, Han et al. ont préparé des nanoparticules chitosane (80-161)/TG2-siARN et ont effectué une injection intratumorale, chez des souris nudes ayant le cancer du sein. Ils ont démontré que l'incorporation du siARN dans le chitosane était nécessaire pour une localisation plus importante du siARN dans la tumeur.[293]

Howard et al. (2009) ont mené une étude, *in vitro*, qui a prouvé que les nanoparticules chitosane/TNF-siARN permettent le silençage efficace du gène codant pour la TNF (facteur de nécrose tumoral) dans les macrophages péritonéaux primaires. TNF est une cytokine qui joue un rôle important dans la réaction de phase aiguë et dans l'inflammation systémique. Son rôle de lutte contre les cellules cancéreuses est assuré suite à sa production par les monocytes activés et les lymphocytes T afin d'entraîner la nécrose des cellules tumorales et ainsi de permettre leur élimination. De plus, l'administration intrapéritonéale des nanoparticules chitosane/TNF-siARN a réduit l'expression du gène codant pour la TNF. Ceci a affecté les réponses inflammatoire et systémique chez les souris souffrant d'arthrite induite par le collagène. Ces résultats présentent par conséquent une nouvelle stratégie pour le traitement de l'arthrite.[294] Andersen et al. (2008) ont montré que, *in vivo*, le silençage pro-inflammatoire de la TNF, chez une lignée cellulaire murine de macrophage RAW 246.7, a été réalisé en utilisant des nanoparticules lyophilisées de

chitosane/siARN.[295] La recherche *in vivo et in vitro* utilisant les nanoparticules chitosane/siARN sont toujours en développement, et sont fort prometteuses.[280]

La formation de complexes chitosane-siARN est possible grâce aux interactions électrostatiques entre les groupements amines chargés positivement du chitosane et les groupements phosphate chargés négativement des acides nucléiques. La force de la complexation joue un rôle important dans la capacité du chitosane à condenser les siARN pour les protéger des nucléases, mais aussi pour libérer les siARN dans le cytoplasme de la cellule. Les nanoparticules chitosane-siARN sont internalisées dans la cellule par endocytose suite aux interactions entre le chitosane chargé positivement et la membrane plasmique chargée négativement. La membrane internalise les complexes par la formation des endosomes (invagination de la membrane cellulaire). Les endosomes se fusionnent avec les lysosomes de la cellule pour former des endolysosomes. Par la suite, les nanoparticules chitosane-siARN s'échappent des endolysosomes et les siARN sont libérés dans le cytoplasme cellulaire. L'échappement des nanoparticules de l'intérieur des endolysosomes se fait par l'effet d'éponge à protons [296]. C'est-à-dire que la maturation des endosomes s'accompagne d'une diminution du pH et d'une augmentation de la charge positive du chitosane. Cette charge positive importante attire les ions chlorures qui vont pénétrer et s'accumuler dans l'endosomes. La présence d'ions chlorures en excès dans les endosomes va pousser l'eau à y rentrer par effet osmotique, ce qui va faire éclater les endosomes. Le chitosane possède un pouvoir tampon permettant de protéger les siARN au cours de leur chemin des endosomes jusqu'aux lysosomes. L'échec de la dé-complexation des siARN et du chitosane est une des causes d'une transfection inefficace aboutissant à l'emprisonnement des nanoparticules et ainsi à la dégradation des siARN par fusion entre les lysosomes, les endosomes et les enzymes lytiques.[297, 298]

2.3.2 PEGylation du chitosane

Afin d'améliorer la pharmacocinétique des nanoparticules à base de chitosane, il est possible de péguyer le chitosane. Cette procédure consiste à fusionner une molécule PEG (polyéthylène glycol) sur le chitosane.[299-302] Le PEG (Poly(ethylene glycol)) est un polymère largement utilisé dans le domaine pharmaceutique vu son caractère hydrophile, sa non-toxicité, sa biodégradabilité et sa biocompatibilité. De nouvelles propriétés physicochimiques sont ajoutées au chitosane par la PEGylation. En effet, cette méthode permet au chitosane d'avoir une meilleure

solubilité et une plus grande perméabilité membranaire, et ainsi de surmonter ses limitations quant à la livraison d'ADN ou de siARN. L'effet protecteur de PEG empêche l'absorption des nanoparticules par le système réticulo-endothélial (RES), aboutissant ainsi à un temps de circulation amélioré.[300] Il a été démontré que la pégylation permet de réduire l'opsonisation des protéines et ainsi empêche la phagocytose des nanoparticules par les cellules non-parenchymateuses du foie (Lu et al., 2009; Betancourt et al., 2009; Ioele et al., 2005).[303-305] Vlerken et al. (2009) ont montré que les nanoparticules pégylées échappaient à l'adsorption par le RES chez la souris présentant le cancer du sein, aboutissant ainsi à un temps de circulation plus important, et les nanoparticules peuvent donc rester dans la tumeur pendant une période plus importante.[306] Malhotra M. et al. (2011) ont testé le pouvoir de livraison génique du chitosane pégylé en le couplant avec du siARN marqué à un fluorochrome. Les résultats obtenus montrent que les nanoparticules peuvent être synthétisées en utilisant le chitosane sous sa forme pégylée, et sont capables de transfecter efficacement les cellules neuronales (Neuro2a) sans aucune toxicité.[301] En plus de la PEGylation du chitosane, la fusion de molécules spécifiques telles que des ligands à la surface des nanoparticules chitosane-siARN s'est avérée avantageuse pour leur internalisation dans les cellules/organes ciblés afin d'induire par la suite le silençage du gène d'intérêt. [3, 299-301]

2.3.3 Biodistribution et biodégradation du chitosane

Le destin métabolique d'un polymère, utilisé dans le domaine de la livraison des médicaments, est important à élucider. Pour que les polymères hydrophiles soient pris par l'absorption systémique, ils doivent avoir la masse moléculaire appropriée pour l'élimination rénale. La biodégradation du chitosane est dépendante de sa masse moléculaire : il a été démontré qu'un chitosane ayant un Mn entre 30 et 40 kDa était éliminé par la clairance rénale.[263, 307] Au-delà de ces valeurs, le polymère sera dégradé en de plus petits polymères par dégradation chimique (dégradation par catalyse acide dans l'estomac) ou enzymatique (lysozyme et microflore dans le colon) avant la clairance rénale.[263, 307] Les lysozymes et les enzymes bactériennes dans le colon hydrolyse les liens N-acétyl-glucosamine–N-acétyl-glucosamine, glucosamine–N-acétylglucosamine et glucosamine–glucosamine.[263, 308-310]

2.3.3.1 Biodistribution des nanoparticules chitosane/siARN

Lors de l'utilisation de nanoparticules à base de chitosane, l'objectif principal est leur prise en charge par les cellules ciblées. Il est possible d'utiliser toute une diversité de nanoparticules à base de chitosane. Celles-ci sont caractérisées par la masse moléculaire et le degré de désacétylation du chitosane, la taille des nanoparticules et les ligands greffés au non aux nanoparticules. Ces différentes caractéristiques obligent les chercheurs à étudier leur impact sur la biodistribution des nanoparticules *in vivo* et le sort final du chitosane après l'internalisation des nanoparticules et la libération de la molécule dans les cellules ciblées. Il est important de noter que les propriétés pharmacocinétiques et la biodistribution sont d'abord déterminées par la charge et la taille de la nanoparticule, et non par le chitosane.[263, 311] Aussi, une fois la molécule d'intérêt livrée à l'intérieure de la cellule, le chitosane libre sera éliminé entre autres par dégradation.[263] Le chitosane peut être modifié de façon à libérer rapidement ou lentement la molécule d'intérêt. La biodégradation du chitosane consiste à son clivage en de plus petits polymères et en monomères (D-glucosamine, N-acétyl-glucosamine). Le DDa et la Mn du chitosane sont les facteurs qui permettent de contrôler le taux de biodégradation.

Afin de déterminer la biodistribution des nanoparticules, le chitosane peut être traqué à l'aide d'un marqueur radioactif ou fluorescent qui se lie à ses amines primaires. Après injection intraveineuse de nanoparticules chitosane/siARN chez des souris, Guo et al, en 2011, ont obtenu une accumulation des nanoparticules surtout au niveau rénal, dont l'intensité est restée forte même après 24 heures. Une faible accumulation a été observée au niveau des poumons et de la rate. Leurs résultats ont permis de conclure que les nanoparticules chitosane/siARN injectées intraveineusement contournent la filtration glomérulaire rapide (contrairement au siARN nu) pour aller s'accumuler au niveau des reins. Ces résultats sont intéressants et peuvent servir dans le cas des maladies rénales.[312] En 2011, Şalva et al. ont étudié la biodistribution des nanoparticules chitosane/VEGF-siARN marqué par la FITC suite à des injections intraveineuses chez les rats présentant la tumeur de cancer du sein. Les résultats obtenus montrent une biodistribution des nanoparticules au niveau du cerveau, du cœur, la rate, le foie, les poumons, les muscles et surtout dans les reins. Les nanoparticules se sont localisées au niveau de la tumeur (cancer du sein) 15 minutes après injections.[313]

En 1999, Richardson et al. ont étudié la biodistribution du chitosane marqué à l'iode 125 (I^{125}), ayant plusieurs Mn (supérieur et inférieur à 5 kDa), chez le rat après injection

intraveineuse. La majorité des chitosanes ayant une Mn supérieure à 5 kDa se sont retrouvés dans le foie, alors que la plupart de ceux ayant une Mn inférieure à 5 kDa avaient un temps de circulation plus long : la majorité a été trouvée dans le sang et 30% dans le foie.[314] Mao et al. ainsi que Huh et al. ont obtenu une accumulation dans les reins et le foie des nanoparticules chitosane/ADN et chitosane/siARN respectivement après injection intraveineuse chez les souris.[315, 316] Le pouvoir des nanoparticules chitosane/siARN à se rendre au site de la tumeur a été présenté par Lee et al. en 2012, dont les résultats ont montré la capacité des nanoparticules à livrer les siARN au niveau de la tumeur, pendant une durée allant jusqu'à trois jours.[291] Ceci a été confirmé par en 2011 par Torchilin et al. qui ont démontré que les nanoparticules chitosane/siARN ayant une taille entre 100 et 500 nm s'accumulent efficacement au niveau de la tumeur.[317] Ce temps de circulation important a été expliqué par la structure vasculaire désorganisée dans les tumeurs, permettant aux nanoparticules de s'y accumuler.[291]

Selon une étude menée par Borja Ballarin-Gonzalez et al. en 2013 sur des souris, l'administration orale des nanoparticules chitosane/siARN a abouti à une accumulation du siARN dans le foie, la rate et le rein une heure après.[318]

Une réduction de 43% du niveau d'expression du gène eGFP dans les régions inférieure et supérieure a été obtenue en administrant les nanoparticules chitosane/eGFP-siARN par voie intranasale chez les souris (Howard et al., 2006).[319] L'administration intranasale des nanoparticules chitosan/siARN est un outil efficace utilisé dans la vaccination ciblant le tissu lymphoïde associé aux muqueuses du pharynx.[320]

2.3.3.2 Dégradation du chitosane : études *in vitro*

Il y a deux types de biodégradation: chimique et enzymatique. La dégradation chimique se fait par catalyse acide (estomac) et la dégradation enzymatique fait appel à des enzymes (ex. chitosanases) qui hydrolysent les liens glucosamine-glucosamine, glucosamine-N-acétyl-glucosamine et N-acétyl-glucosamine-N-acétyl-glucosamine.[321] Chitosanase est une enzyme membre de la famille glycosyl hydrolase, permettant d'hydrolyser le chitosane. Les chitosanases sont surtout retrouvées chez les microorganismes dont circulans MH-K1, *Streptomyces* sp. N174, *Nocardioïdes* sp. N106 et *Fusarium solani* f. sp.phaseoli SUF386.[322-324] En général, la biodégradation du chitosane est proportionnelle au degré de désacétylation.[308, 325]

La dégradation du chitosane peut être vérifiée, *in vitro*, en mesurant la diminution dans la masse moléculaire. Plusieurs méthodes existent à cette fin, dont la mesure de la viscosité (viscométrie) et la chromatographie par perméation sur gel. [326] Parmi les protéases connues, les leucines amino-peptidases se sont avérées les plus efficaces en dégradant les films de chitosane à 38% en 30 jours.[327] Il a été aussi démontré que la dégradation du chitosane était reliée à son degré de désacétylation et sa masse moléculaire.[328] Afin de minimiser la dégradation prématurée du chitosane, des modifications, comme le "crosslinking covalent" et la thiolation, peuvent être introduits. [329, 330]

La stabilité des siARN contre la digestion par les nucléases est importante afin d'obtenir le taux de silençage maximale dans les cellules. Katas et al. (2006) ont étudié la stabilité des nanoparticules chitosane/siARN en présence de 5 et de 50% de FBS à 37°C.[282] Selon la première condition, le siARN nu a été totalement dégradé après 48 heures, tandis que celui qui faisait partie des nanoparticules était totalement dégradé après 72 heures. En présence de 50% de sérum, le siARN nu était totalement dégradé dès qu'il était mis dans le milieu, alors que celui provenant des nanoparticules était dégradé après 48 heures d'incubation.[331]

2.3.3.3 Dégradation du chitosane : études *in vivo*

La dégradation du chitosane dépend de sa voie d'administration. Par voie sous-cutanée, le chitosane est souvent introduit sous forme d'implant. Un substitut de peau de gutaraldéhyde lié au chitosane/collagène est stable, comparé au collagène seul, quand implanté chez les lapins.[332] Chez les souris, la dégradation des hydrogels liés avec du chitosane (azide-chitosane-lactose) a été étudiée en mesurant la libération du trypan bleu, un chromophore acide. Afin de vérifier les résultats *in vitro*, démontrant que le chromophore était stable, le gel a été introduit comme un implant et le pourcentage de l'implant restant a été mesuré. Seulement 10% de l'implant restait après 14 jours.[333]

Quant à la voie intraveineuse, peu d'études ont été réalisées dans ce domaine, expliquant le manque d'information sur le mécanisme de dégradation du chitosane par cette voie. Selon une étude menée par Saito et al. (en 2006) *in vivo* chez les souris, la présence du chitosane dans le sang aboutit à la sécrétion de lysozyme et à l'activation des macrophages.[334] Ce groupe a développé une feuille en chitosane (généralement utilisée pour fermer les plaies) et ont étudié la possibilité d'utiliser une feuille en chitosane contenant de l'adriamycine (Doxorubicine sous

forme commerciale) pour une sécrétion contrôlée du médicament. Cette feuille en chitosane contenant de l'adriamycine a été insérée dans la cavité péritonéale chez les souris, et la biodégradation du chitosane a été mesurée. Adriamycine a été présente dans la feuille en chitosane pendant deux mois sans être digérée par des enzymes.[334]

Une étude réalisée par Hirano et al., 1991, chez les lapins a démontré que la dégradation d'un mélange d'oligosaccharides du chitosane administré intraveineusement, à une concentration de 7.1 à 8.6 mg/kg, dépend de sa masse moléculaire et a lieu au niveau du foie et des rates. Il a été démontré que le chitosane augmentait l'activité des lysozymes dans le sang, entraînant ainsi sa dégradation. [335]

Le sort des nanoparticules de chitosanes/acides nucléiques injectées par voie intraveineuse dépend de leur diamètre. En effet, les nanoparticules ayant un diamètre plus petit que 100 nm possèdent un temps de circulation dans le sang plus important que celles ayant un diamètre supérieur à 100 nm. Ces dernières sont captées par le système réticulo-endothélial de la rate.[336]

Par voie orale, le chitosane est dégradé dans le tractus gastro-intestinal, et sa dégradation dépend de son DDA. Cependant, il semble que l'efficacité de la dégradation varie d'une espèce à l'autre et selon le nombre de NH_2 disponibles dans la structure du chitosane : il s'est avéré que chez les poules, la dégradation est plus importante que les lapins (67-98% vs 39-83% de dégradation après ingestion orale). [337]

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Ce projet de recherche consiste à resensibiliser les cellules cancéreuses MCF-7 MDR en utilisant des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN et de tester l'effet de la nature des bouts dépassants en 3' des duplexes sur l'efficacité du silençage du gène MDR1.

3.1 Synthèse des siARN

Dans un premier temps, quatre séquences de siARN ont été choisies.

Les siARN utilisés pour cette étude ont été chimiquement synthétisés par Technologies (Thermo Scientific, Dharmacon RNAi Technologies, Lafayette, CO). Au total, quatre duplexes de siARN ont été synthétisés: siARN_1, siARN_1M, siARN_2 et siARN_2M. Chacun des brins des duplexes est formé au total de 21 acides nucléiques, dont deux acides nucléiques dépassants à l'extrémité 3'. Les siARN_1 et siARN_1M sont complémentaires à la séquence d'acides nucléique (577-595 acides nucléiques) du gène MDR1 alors que les siARN_2 et siARN_2M sont complémentaires à une séquence du même gène, mais légèrement décalée en aval (583-607 acides nucléiques). Les duplexes ARN_1 et ARN_2 sont formés d'ADN au niveau des bouts dépassants alors que les duplexes ARN_1M et ARN_2M sont formés exclusivement d'ARN. Les séquences sens et anti-sens des siARN_1, siARN_1M, siARN_2 et siARN_2M sont présentées dans le **Tableau 3.1**

Le choix des séquences de siARN_1 et siARN_2 a été basé sur les travaux de Hao Wu et al. (2003), Stege et al. (2004), Miletto-Gonzalez et al. (2005), et Stierle et al. (2004) qui ont utilisé les duplexes, correspondant à ceux que nous avons renommés siARN_1 et siRNA_2, pour étudier le silençage du gène MDR1 dans des cellules cancéreuses.[3-5]

Ces duplexes de siARN comportaient des bouts dépassants formés d'ADN. L'utilisation de l'ADN aux extrémités overhang 3' est bien connue depuis les débuts des recherches sur les siARN synthétiques (Elbashir, 2001). [219] L'ADN permet d'augmenter la stabilité des duplexes car les ARN sont plus vulnérables aux nucléases et particulièrement en absence d'un système de livraison. Les siARN_1M et siARN_2M ont été ajoutés à notre étude en raison des résultats obtenus par Strapps et al. (2010) en utilisant des lipoplexes (LNPs) formés à partir du mélange du lipide cationique CLinDMA (2-(4-[(3b)-cholest-5-en-3-yloxy]-butoxy)-N,N-diméthyl-3-[(9Z,12Z)-octadéca-9,12-dien-1-yloxy]propan-1-amine), cholestérol, et PEG-DMG

(monométhoxy(polyéthylèneglycol)-1,2-dimyristoylglycérol) selon des ratio molaires de 50.3 : 44.3 : 5.4. Ses travaux ont démontré que le silençage est pareil, mais que la durée du silençage, *in vivo* et *in vitro*, est plus importante lorsque les bouts dépassants en 3' des duplexes siARN sont formées de ribonucléotides comparativement aux bouts dépassants formés de désoxyribonucléotides. [6]

Les siARN, reçus lyophilisés, ont été resuspendus dans l'eau ultra pure certifiée sans ADNase et ARNase, afin d'obtenir une solution stock de 40 μM (0.531 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Des aliquotes de 25 μL ont été préparées et conservées à -80°C.

Tableau 3.1 Séquences des brins sens et anti-sens des duplexes siARN_1, siARN_1M, siARN_2 et siARN_2M et la région ciblée au niveau de l'ARNm du gène ABCB1 (MDR1)

	Sens	Anti-sens	Région ciblée de l'ARNm du gène MDR1
siARN_1	5'-GGAAAAGAAACCAACUGUCdTdT-3'	5'-GACAGUUGGUUUCUUUCCdTdT-3'	577-595
siRNA_1M	5'-GGAAAAGAAACCAACUGUCrArG-3'	5'-GACAGUUGGUUUCUUUCCrUrU-3'	577-595
siRNA_2	5'-GAAACCAACUGUCAGUGUAdTdT-3'	5'-UACACUGACAGUUGGUUUCdTdT-3'	583-601
siRNA_2M	5'-GAAACCAACUGUCAGUGUArUrU-3'	5'-UACACUGACAGUUGGUUUCrUrU-3'	583-601

3.2 Préparation du chitosane 92-10-5 [DDA-Mn-N :P]

Pour cette étude le chitosane a été choisi comme système de livraison des siARN.

Le chitosane 92-10 [DDA-Mn] a été séché sous vide durant au moins 16 heures afin d'éliminer toute trace d'eau résiduelle. Des solutions de 5 mg/ml de chitosane 92-10 [DDA-MM] ont été préparées dans de l'eau ultra pure, certifiée sans ADNase et ARNase, en ajoutant aussi du HCl (1N) de façon à obtenir un ratio monomère glucosamine: HCl de (1 : 1). La dissolution du chitosane a été assurée par une incubation de 16 heures sous agitation constante à température de la pièce. La solution de chitosane a été filtrée sur des filtres à seringue de 0,22 μm , puis a été diluée dans l'eau ultra pure stérile, certifiée sans ADNase et ARNase de façon à obtenir le ratio amine de chitosane : phosphate d'ARN de 5 :1.

La dilution du chitosane nécessaire pour obtenir le ratio N :P désiré, lorsqu'un volume du chitosane dilué est ajouté à un volume d'ARN, est calculée selon la formule suivante :

$$V_i \text{ Chitosane} = [(V_{\text{siARN}} * C_{\text{siARN}})/M] * \text{Ratio désiré}] * [M_{\text{chito}} / [(DDA\%/100) * V_{\text{chito}}]] * (V_f / C_i)$$

V_{siARN} : Volume de siARN (μl)

C_{siARN} : Concentration de siARN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

M : Masse moléculaire moyenne des acides nucléiques = 309 g/mol

M_{chito} : Masse moléculaire du chitosane (g/mol)

V_f : volume final (c.-à-d. le volume total une fois le chitosane ajouté aux siARN) (ml)

C_i : concentration initiale du chitosane (5mg/ml)

Pour déterminer la dilution du chitosane nécessaire afin d'obtenir un ratio N : P de 5, lorsque la concentration initiale de chitosane 92-10 (M_{chito} 164,56) est de 5 mg/ml, que la concentration initiale des siARN est de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et que le volume final de chitosane dilué désiré est de 0,4ml :

$$V_i \text{ Chitosane} = [(200 \mu\text{l} * 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l})/309] * 5] * [164,56 \text{g/mol} / [(92/100) * 200 \mu\text{l}]] * (0,4 \text{ ml} / 5 \text{mg/ml}) = 0.01152 \text{mL}$$

Dans cet exemple, 11.52 μl de chitosane (5 mg/ml) doit être ajouté à 388.48 μl H_2O (volume total de 0,4 ml) pour obtenir une solution de chitosane diluée ayant un ratio N :P de 5 lorsqu'un volume de ce chitosane dilué est mélangé à un volume d'ARN (0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

3.3 Préparation des nanoparticules chitosane/siARN

Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN ont été formées en ajoutant le chitosane 92-10 aux siARN correspondant (MDR1-siARN, ou siGLOTM), selon un volume de 1 pour 1, en mélangeant rapidement avec la pipette par des mouvements de "up and down" (~20 fois). Par exemple, un volume de 100 μL de la solution de chitosane préparée telle que décrite dans la section 3.2 de ce chapitre, au ratio N: P de 5, a été ajouté dans un tube eppendorf de 1,5 ml, certifié sans ADNase et ARNase, contenant un volume de 100 μL de siARN à une concentration initiale de 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Les solutions ont été immédiatement et vigoureusement mélangées par pipetage "up and down" (~20 fois) puis ont été incubées durant 30 minutes à la température de la pièce afin d'assurer la formation complète des nanoparticules chitosane/MDR1-siARN. La

concentration finale des siARN correspondait donc à 0,025 µg/µl. Les volumes de chitosane et de siARN utilisés pour préparer les nanoparticules peuvent varier entre 25 µL et 200 µL selon les besoins. Par contre, il est primordial de garder des volumes égaux de chitosane et de siARN.

3.4 Analyse de la taille et du potentiel ζ des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN

Les nanoparticules ont été préparées tel que décrit dans la section 3.3 de ce chapitre. Les nanoparticules ont été diluées dans du chlorure de sodium (10 mM) à un ratio 1:5 dans des cuvettes. Les cuvettes ont été insérées dans l'appareil Zetasizer Nano Zs (Malvern, Worcestershire, UK) afin de déterminer la taille hydrodynamique des nanoparticules via la diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les mesures ont été réalisées en triplicata et chacune des trois valeurs obtenues correspond à la moyenne de 10 mesures différentes de l'échantillon.

Après l'analyse de la taille des nanoparticules, le mélange a été dilué en utilisant la solution de chlorure de sodium (10 mM) selon un ratio 1:2 (ratio total nanoparticules:NaCl est alors 1:10) dans le même vial utilisé pour la mesure de la taille. Le mélange, ayant un volume final de 950 µL, a été transféré dans une cuvette pour mesurer le potentiel zêta en utilisant le Malverne Zetasizer. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata et chacune des trois valeurs obtenues correspond à la moyenne de 15 mesures différentes de l'échantillon.

3.5 Culture cellulaire

3.5.1 Culture des MCF-7 et MCF-7 MDR

Les cellules MCF-7 ont été mises en culture dans le milieu de culture EMEM (Eagle's minimal essential medium) contenant de l'insuline (1/1000). Les cellules MCF-7 MDR ont été maintenues dans le milieu de culture RPMI-1640 en présence de doxorubicine (1/1000). Les deux milieux de culture ont été complétés avec 10% du sérum bovin fœtal (FBS). Les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR ont été gardées dans un incubateur à 37°C, contenant 5% CO₂.

3.5.2 H1299 eGFP⁺

Les cellules H1299 eGFP⁺ ont été mises en culture dans le milieu de culture RPMI-1640 contenant 10% du sérum bovin fœtal (FBS). Les cellules H1299 eGFP⁺ ont été gardées dans un incubateur à 37°C, contenant 5% CO₂

3.6 Procédure de transfection avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN

Un jour avant la transfection, le chitosane a été préparé tel que décrit dans la section 3.2 de ce chapitre et le milieu de transfection DMEM (0.976 g/L MES et 0.84 NaHCO₃) a été préparé à un pH de 6.5 (sans FBS), filtré et gardé dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂ toute la nuit. De plus, les cellules H1299 eGFP⁺, MCF-7 ou MCF-7 MDR ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits à une densité cellulaire permettant d'obtenir une confluence cellulaire de 70% le jour de la transfection. Les plaques ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ toute la nuit.

Le jour de la transfection, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN, chitosane (92-10-5)/ siGLOTM, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2 ou chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M ont été préparées tel que décrit dans la section 3.3 de ce chapitre. La concentration finale des siARN était de 0,025 µg/µl.

Les nanoparticules ont été ensuite incubées 37°C et 5% CO₂ dans une plaque fantôme "ghost plate" sans cellules et contenant le milieu de transfection DMEM à une concentration finale de siARN de 100 nM par puits. Une fois le milieu de culture (EMEM ou RMPI) aspiré de la plaque contenant les cellules, un volume de 500 µL de nanoparticules a été transféré des puits de la plaque fantôme vers les puits appropriés de la plaque de transfection. Les plateaux contenant les cellules et le milieu de transfection ont été incubés 24 heures à 37°C et 5% de CO₂. Notons que, quatre heures après transfection, du FBS a été ajouté dans chacun des puits de façon à obtenir une concentration finale de 10% de FBS. Le milieu de culture des puits a été remplacé par du milieu frais tous les 24 h jusqu'au moment des analyses.

Notons que les cellules non transfectées (cellules MCF-7 et MCF-7 MDR) ont été utilisées comme contrôle négatif.

3.7 Procédure de transfection avec les lipoplexes (DharmaFect/siARN)

Comme contrôles positifs et négatifs, DharmaFECT™ (Dharmacon RNAi Technologies) et des cellules non transfectées (cellules MCF-7 et MCF-7 MDR) ont été respectivement utilisés.

Dans ce projet, le lipide DharmaFECT™ (Dharmacon RNAi Technologies) a été utilisé comme contrôle positif vu son efficacité de transfection.[338] Cependant, il est important de prendre en considération que DharmaFECT présente une toxicité cellulaire, pour cette raison il est important de changer le milieu de culture cellulaire 4 heures après la transfection avec les lipoplexes DharmaFECT/siARN.[339]

Une solution fille de siARN (eGFP-siARN, ou MDR1-siARN) de 2 μM a été préparée à partir de la solution stock de siARN (40 μM). Dans un premier tube (A), 80 μL de siARN (2 μM) a été ajouté à 80 μL de milieu sans sérum (EMEM pour les cellules MCF-7 et RPMI1840 pour les cellules MCF-7 MDR et H1299eGFP⁺). Dans un deuxième tube (B), 6.4 μL de DharmaFECT 1 (pour la transfection des cellules MCF-7 et MCF-7 MDR) ou DharmaFECT 2 (pour la transfection des cellules H12992GFP⁺) a été mélangé à 153.6 μL de milieu sans sérum (EMEM pour les cellules MCF-7 et RPMI1840 pour les cellules MCF-7 MDR et H1299eGFP⁺). Les deux tubes ont été incubés pendant 5 minutes à la température de la pièce puis le contenu du tube B a été transféré dans le tube A et le tout a été incubé pendant 20 minutes à la température de la pièce. Une fois l'incubation terminée, un volume de 1280 μL de milieu (EMEM pour les cellules MCF-7 et RPMI1840 pour les cellules MCF-7 MDR et H1299eGFP⁺) avec 10% de sérum a été ajouté au mélange. Un volume de 500 μL des lipoplexes DharmaFECT-siARN a été ensuite pipeté dans une plaque fantôme "ghost plate". Une fois le milieu de culture (EMEM ou RMPI) aspiré de la plaque contenant les cellules, le mélange (500 μL) a été transféré dans les puits appropriés de la plaque de transfection. Quatre heures après la transfection, le milieu contenant les lipoplexes DharmaFECT/siARN a été changé pour un milieu complet. Ensuite le milieu de culture des puits a été remplacé par du milieu frais tous les 24 h jusqu'au moment des analyses.

3.8 Analyse, par microscopie confocale, de l'internalisation des nanoparticules chitosane 92-10/ siGLO™ dans les cellules MCF-7 MDR

La microscopie confocale est une méthode qualitative permettant de visualiser l'internalisation des nanoparticules dans les cellules. La microscopie confocale permet de

localiser les nanoparticules et de définir leur position par rapport à leur environnement cellulaire. L'obtention de ces images est possible grâce au marquage des nanoparticules avec des fluorochromes et à leur excitation par un rayon laser à une longueur d'onde spécifique. Une fois les nanoparticules marquées excitées, elles émettent une fluorescence détectée par un photomultiplicateur qui permet de générer l'image.

Le chitosane utilisé dans ce projet (92-10) a été marqué avec de la rhodamine B isothiocyanate (RITC) et a été par la suite complexé avec des siGLO™. Le siGLO™ est un composé développé par Dharmacon permettant de vérifier l'internalisation cellulaire des siARN et donc l'efficacité de la transfection. Les siGLO™ sont des ARN double-brins synthétisés chimiquement et marqués avec du 6-FAM. Ainsi il est possible de localiser avec précision le chitosane et les duplexes de siARN et de déterminer s'il y a internalisation des nanoparticules dans les cellules MCF-7 MDR. Les siGLO™ ont été chimiquement modifiés afin d'échapper au complexe RISC. Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siGLO™ ont été préparées comme décrit dans la section 3.3. Les cellules MCF-7 MDR ont été tout d'abordensemencées, selon une densité de 40 000 cellules par boîte de Petri stériles à fond en verre (P35G-1.5-14-C, MatTek, Ashland, MA, USA) puis ont été incubées toute la nuit à 37°C et à 5% CO₂. Ensuite les cellules ont été transfectées comme décrit dans la section section 3.6 avec une concentration de siGLO™ de 100 nM. Les cellules transfectées ont été incubées 24 heures à 37°C et à 5% CO₂. Dans le but de minimiser tout risque de photoblanchiment des RITC et 6-FAM, les manipulations ont été effectuées à l'abri de la lumière. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu de culture frais et les cellules ont été observées avec le microscope confocal Zeiss LSM510 META Axioplan 200 (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON, Canada). Les marqueurs FAM et le RITC ont été excités respectivement à une longueur d'onde de 494 nm (filtre passe-bande d'émission 510/520 nm) et 543 nm (filtre passe-bande d'émission 565/615 nm). Le RITC excité émet une couleur rouge, le FAM émet une couleur verte et ainsi la superposition de ces deux couleurs donnera la couleur jaune caractéristique aux nanoparticules chitosane (92-10-5)/siGLO™.

3.9 Vérification du pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN

Afin de tester le pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN, nous avons utilisé des cellules H1299 eGFP⁺ et des nanoparticules siARN dirigées contre le gène eGFP. Les cellules H1299 eGFP⁺ sont des cellules cancéreuses du poumon modifiées afin

d'exprimer de façon continue la protéine eGFP. La protéine eGFP «Enhanced Green Fluorescent Protein» exprimée dans les cellules émet donc une fluorescence verte.

La veille de la transfection, le chitosane 92-10 a été préparé tel que décrit dans la section 3.2. Les cellules H1299 eGFP⁺ ont étéensemencées selon une densité de 45 000 cellules par puits dans une plaque de 24 puits pour donner une confluence entre 70 et 75% le jour de la transfection. Le jour de la transfection, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ eGFP-siRNA ont été préparées tel que décrit dans la section 3.3 de façon à obtenir une solution de nanoparticules ayant une concentration finale de 0.05µg/µL. Des nanoparticules DharmaFECT2/eGFP-siRNA ont été utilisées comme contrôle positif lors des transfections cellulaires et elles ont été préparées tel que décrit dans la section 3.7. Comme contrôles négatifs, des cellules ont été mises en contact avec le chitosane seul (sans siARN) ou avec des nanoparticules formées de chitosane (92-10-5) et de siRNA ne ciblant aucun gène (non-targeting). Les cellules ont été transfectées tel que décrit dans la section 3.6 et chaque condition a été réalisée en triplicata. Après une durée de 48 heures post-transfection, les cellules adhérentes ont été détachées du fond des puits en les incubant avec 75 µL de trypsine 0.25% (Life Technologies, Numéro de produit : 25209-072) pendant 3 min dans un incubateur 37°C, 5% CO₂. La trypsine a été par la suite inactivée en ajoutant 325 µL du milieu complet RMPI-1640 dans chaque puits. Les cellules ont été ensuite transférées dans des tubes falcon placés sur glace jusqu'à l'analyse de la fluorescence cellulaire.

L'intensité de la fluorescence verte des cellules et le pourcentage total de cellules fluorescentes ont été déterminés par l'utilisation de la cytométrie en flux (FACS) à l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (IRIC). Les résultats ont été obtenus en utilisant le logiciel FACSDiva version 6.1.3. Ces données nous ont permis de déterminer l'efficacité de transfection et de silençage des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN. En effet, le nombre de cellules fluorescentes varie de façon inversement proportionnelle à l'efficacité de transfection et de silençage des nanoparticules. Autrement dit, plus il y a de transfection et un silençage du eGFP, moins les cellules sont fluorescentes.

La cytométrie en flux, FACS, est la technique la plus performante et sensible permettant de caractériser des cellules individuellement, les compter et les trier selon des caractéristiques phénotypiques spécifiques, comme la fluorescence émise, la taille et la structure. Cet appareil est formé de systèmes informatique, électronique, optique et fluidique. Dans un premier temps, à l'aide du système fluidique, les cellules sont suspendues à l'intérieur d'une chambre d'analyse

("buse"). Par la suite, cette suspension cellulaire est entraînée, selon le principe d'hydrofocalisation, dans un deuxième flux appelé le liquide de gaine. C'est ainsi que, par l'intermédiaire d'un laser, chaque cellule est individualisée. Lors de son passage devant le laser, chaque cellule va émettre des signaux qui seront captés, transformés en signaux électriques, et enregistrés par un système de filtres et de photomultiplicateurs. [340]

3.10 Confirmation, par RT-PCR, de la présence d'ARNm spécifiques au gène MDR1

Avant d'envisager le silençage du gène MDR1, il était primordial de confirmer la présence de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR. Cette confirmation a été effectuée par une réaction RT-PCR suivie d'un séquençage. Le séquençage du gène MDR1 à partir des cellules MCF-7 MDR était crucial pour s'assurer que le gène était exempt de mutations qui compromettraient la complémentarité des siARN. Les cellules MCF-7 MDR ont été cultivées pendant 24 heures puis l'ARN total a été extrait (section 3.11.5), quantifié (3.11.6) et rétrotranscrit en ADNc (3.11.5).

3.10.1 Amplification d'une séquence du gène MDR1 par PCR

Une région de l'ADNc MDR1 obtenu par la transcription inverse des ARN a été ensuite amplifiée par PCR. Pour chaque réaction PCR, un volume de 1,5 μL (équivalent à 25 ng) d'ADNc a été ajouté dans tube contenant un volume réactionnel final de 50 μL contenant 5 μL de tampon 10X (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM), 1,5 μL de MgCl_2 à 50 mM, 1 μL du mélange de dNTP à une concentration de 10 mM, 0,2 μL de la taq ADN polymérase Platinum (1 unité) et 1 μL de chacune des amorces à une concentration de 10 μM . Les séquences des amorces utilisées pour cette réaction sont décrites dans le **Tableau 3.2**. La séquence de l'ADN complémentaire de l'ARN messager du gène MDR1 ainsi que la séquence ciblée par les siARN_1 et siARN_1M, siARN_2 et siARN_2M et celles correspondants au site complémentaire des amorces forward et reverse ont été présentées dans la **Figure 3.1**. Les tubes ont été transférés dans un thermocycleur puis incubés à 94°C pendant 2 minutes pour dénaturer complètement la matrice (ADNc) et activer la taq polymérase. Au total, 30 cycles d'amplification ont été réalisés comme suit : 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et une minute et demie d'extension à 72°C.

Tableau 3.2 Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification du gène MDR1

Amorce	Séquence
forward	5' AAGCCAGAACATTCCTCCTG 3'
reverse	5' GACAGCAGCTGACAGTCCAA 3'

```

1  aaacacttgattaccatTTTTAAAGGCTATCATTACTCTTTACCTGTGAAGAGTAGAACA
61  tgaagaaatctactTTATTcagatattctccagattcctaagattagagatcatttctc
121 attctcctaggagtactcacttcaggaagcaaccagataaaaagagaggtgcaacggaagc
181 cagaacattcctcctggaaattcaacctgtttcgcagtttctcgaggaatcagcattcag
241 tcaatccggggccgggagcagtcacatctgtggtgaggtgattggtgggcaggaacagcgc
301 cggggcggtgggctgagcacagccgcttcgctctctttgccacaggaagcctgagctcatt
361 cgagtagcggctcttccaagctcaaagaagcagaggccgctgttcgtttccttttaggtct
421 ttccactaaagtcggagtatcttcttccaaaatttcacgtcttgggtggccgttccaagga
481 gcgcgaggtcggaaatggatcttgaagggaccgcaatggaggagcaaagaagaagaactt
541 ttttaaactgaacaataaaaagtgaaaaagataaagaaggaaaaagaaaccaactgtcagtg
601 attttcaatgtttcgtatttcaaattggcttgacaagttgtatatggtggtgggaacttt
661 ggctgccatcatccatggggctggacttcctctcatgatgctggtgtttggagaaatgac
//
1021 agatgatgtctccaagattaatgaaggaattggtgacaaaattggaatgttctttcagtc
1081 aatggcaacatTTTTcactgggtttatagtagatttacacgtggttgaagctaaccct
1141 tgtgatTTTtgccatcagtcctgttcttggactgtcagctgctgtctgggcaaagatact
1201 atcttcatttactgataaagaactcttagcgtatgcaaaagctggagcagtagctgaaga
1261 ggtcttggcagcaattagaactgtgattgcatttggaggacaaaagaagaacttgaaag
//
4201 catccagaatgcagacttaatagtgggtgtttcagaatggcagagtcaaggagcatggcac
4261 gcatcagcagctgctggcacagaaaggcatctatTTTTcaatggtcagtggtccaggctgg
4321 aacaaagcgccagtggaactctgactgtatgagatgttaaatactTTTTaatatttgTTT
4381 gatatgacatttattcaaagttaaaagcaaacacttacagaattatgaagaggtatctgt
4441 ttaacatttcctcagtcaggttcagagtccttcagagacttcgtaattaaaggaacagagt
4501 gagagacatcatcaagtggagagaaatcatagtttaaactgcattataaattttataaca
4561 gaattaaagtagattttaaaagataaaatgtgtaattttgtttatatTTTccatttggga
4621 ctgtaactgactgccttgctaaaagattatagaagtagcaaaaagtattgaaatgtttgc
4681 ataaagtgtctataataaaaactaaactttcatgtgaaa

```

Figure 3.1 Séquence de l'ADN complémentaire de l'ARN messager du gène MDR1 (NCBI : NM_000927). La séquence ciblée par les siARN_1 et siARN_1M est surlignée en bleu. La séquence ciblée par les siARN_2 et siARN_2M est en gras et soulignée en noir. Les séquences correspondantes au site complémentaire des amorces forward et reverse sont surlignées respectivement en jaune et rose. Les codons «Start» et «Stop» sont surlignés respectivement en vert et en rouge.

3.10.2 Purification des produits PCR

Une fois la PCR terminée, les amplicons ont été analysés sur gel d'agarose 2%. L'UltraPure™ Agarose-1000 (Life Technologies) a été utilisé pour la préparation du gel; il est spécifiquement formulé pour la séparation des fragments de PCR à haute résolution. Le standard de poids moléculaire "1kb Plus " (Life Technologies) a été utilisé pour évaluer le poids moléculaire des amplicons. Les fragments ont été séparés par électrophorèse à 85 V pendant 1 heure et demie à température de la pièce. Les bandes obtenues ont été révélées suite à une coloration au bromure d'éthidium : le gel a été trempé dans une solution de bromure d'éthidium (0.5 µg/mL) pendant 15-20 minutes. Le gel a été par la suite placé sous lumière UV pour visionner les bandes.

Les amplicons séparés sur gel d'agarose ont été isolés et purifiés en utilisant le Kit "QIAquick Gel Extraction" (Qiagen). Le kit "QIAquick Gel Extraction" est un système de centrifugation utilisant une colonne ayant une membrane de silice. En présence de haute concentration de sel (solution tampon), l'ADN se lie à la membrane de silice, laissant passer les contaminants (enzymes, nucléotides, agarose, sels, bromure d'éthidium, amorces restantes de la PCR, etc.) à travers la colonne. Une étape de lavage suit pour éliminer complètement les impuretés et l'ADN est enfin élu.

Afin de quantifier l'ADN élu, un volume de 2 µL des échantillons a été placé sur les micropuits respectifs de la plaque "Take3™ Multi-Volume" puis l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 260 nm par spectrophotométrie en utilisant le système "Epoch™ Multi-Volume" et le logiciel Gen5™. Ensuite, l'ADN élu a été migré une seconde fois sur un gel d'agarose 2% pour s'assurer de la pureté des bandes et des produits purifiés.

3.10.3 Séquençage des amplicons par électrophorèse capillaire

Finalement, les amplicons purifiés ont été séquencés par la technique de Sanger au service de séquençage de l'institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC) en utilisant les amorces présentées dans le **Tableau 3.2**. Le logiciel BioEdit a permis l'analyse des séquences et la comparaison avec la séquence référence du gène MDR1 (NCBI : NM_000927).

3.11 Analyse quantitative du silençage du gène MDR1 par qPCR

L'efficacité du silençage du gène MDR1 dans les cellules traitées a été évaluée en quantifiant l'expression du gène MDR1, codant pour la P-gp, par des réactions d'amplification en temps réel (qPCR).

3.11.1 La méthode

La qPCR est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR et qui est mesurée à chacun des cycles (en temps réel). Pour effectuer cette qPCR, la technologie Taqman a été utilisée en raison de sa grande sensibilité et spécificité.

La réaction Taqman nécessite la présence de l'ADNc du gène d'intérêt, des amorces et des sondes. Ces sondes sont des oligonucléotides qui se lient à l'ADN ciblé, mais ne peuvent pas être prolongées par l'action de l'enzyme Taq polymérase en raison de l'absence du groupement hydroxyle libre. Ces sondes contiennent un fluorochrome émetteur (ex. FAM: 6-carboxyfluorocéine) à l'extrémité 5' et un fluorochrome suppresseur (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) à l'extrémité 3'. Lorsque le fluorochrome émetteur et le suppresseur sont proches l'un de l'autre, c'est-à-dire quand la sonde est intacte, l'énergie de l'émetteur excité est transmise vers le suppresseur et donc aucune émission de l'émetteur n'est détectée. Ce phénomène est connu sous le nom de FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer). Cependant, lorsque l'émetteur et le suppresseur se séparent, lors de la phase d'extension de la qPCR, l'émetteur produira une fluorescence détectable. La réaction de qPCR débute par la dénaturation de l'ADN à haute température. Au fur et à mesure que la température diminue, les amorces et les sondes se lient à l'ADN par complémentarité. La Taq Polymérase se lie aux amorces et déclenche la phase d'extension en créant de nouveaux brins d'ADN complémentaires. Cette enzyme possède une activité 5'-exonucléasique et sépare l'émetteur du suppresseur, et ainsi engendre une augmentation dans l'intensité de la fluorescence qui est proportionnelle aux amplicons produits (**Figure 3.2**).

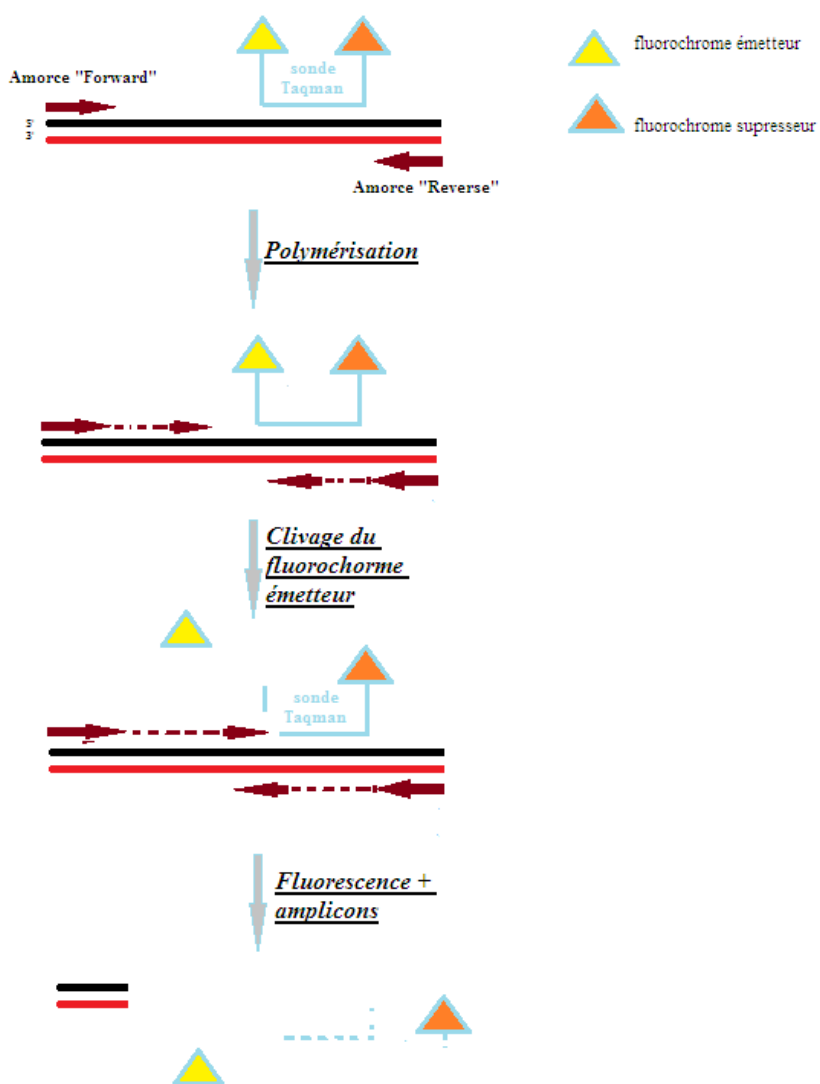


Figure 3.2 Réaction Taqman [341]

Pour cette étude, nous avons utilisé une méthode de quantification relative en choisissant le modèle de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). Le cycle de quantification (Cq) correspond au point où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. La méthode de quantification relative repose sur la comparaison de la variation d'expression du gène ciblé (MDR1) avec celle d'un gène de référence. Il était donc primordial de choisir un gène de référence stable dans les conditions de transfection afin d'assurer des résultats

fiables. Pour cette raison, la stabilité de différents gènes a été testée et le meilleur candidat a été sélectionné pour la normalisation des données avec la méthode de quantification relative.

3.11.2 Test de stabilité de 8 gènes de référence

Dans le but d'évaluer l'efficacité du silençage du gène MDR1 par l'utilisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, il était nécessaire de mettre au point une méthode fiable de quantification relative de l'ARNm du gène MDR1. Pour ce faire il était primordial de choisir adéquatement les gènes de références à utiliser pour comparer les variations d'expression du gène MDR1 ciblé. Ainsi, il était nécessaire de réaliser une étude sur la stabilité des gènes de références choisis pour la normalisation de la méthode de quantification relative ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) aussi appelée la méthode de Livak. Il est, en effet, déconseillé de choisir un gène de référence basé uniquement sur la littérature. Une étude de stabilité de plusieurs gènes de référence sous les conditions expérimentales doit être réalisée.[342]

Selon les lignes directrices de MIQE ("Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments" ou "minimum d'information pour la publication d'expériences de PCR en temps réel"), la normalisation avec un seul gène de référence n'est pas acceptable à moins que les chercheurs présentent des preuves évidentes que l'expression de ce gène de référence ne change pas dans les conditions expérimentales utilisées [342].

Dans le but d'identifier le gène de référence le plus stable qui devrait être utilisé comme facteur de normalisation, huit gènes de référence (GAPDH, ACTB, POLR2A, PUM1, TFRC, TBP, ELF1a, PBGD) ont été choisis en s'inspirant de la littérature. La stabilité de ces gènes a été ensuite vérifiée par qPCR après le traitement (ou l'absence de traitement) des cellules avec du chitosane seul, avec des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN ou avec des lipoplexes DharmaFECT/MDR1-siARN.

Dans le but de mettre au point un test qPCR fiable pour quantifier les variations du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR, on a déterminé le gène de référence ayant la meilleure stabilité par qPCR. Les réactions de qPCR réalisées étaient formées de 40 cycles (dénaturation-hybridation-élongation). Le Cq «Quantification cycles» correspond au nombre de cycles nécessaires pour que le signal de la fluorescence atteigne le seuil de détection. Moins il y a d'ARNm du gène d'intérêt, plus le nombre de cycles d'amplification est nécessaire pour détecter

la fluorescence et donc plus la valeur Cq est élevée (ex. 30-35 cycles). Au contraire, plus il y a présence d'ARNm du gène d'intérêt, moins le nombre de cycles d'amplification est nécessaire avant de détecter la fluorescence et plus la valeur du Cq est petite (ex. 10-15 cycles). La valeur Cq est celle qui est utilisée pour analyser les résultats de la qPCR. Les valeurs Cq obtenues pour chacun des différents gènes de références ont été comparées, en pair, dans des conditions où les cellules étaient transfectées ou non transfectées. Le programme ExpressionSuite a été utilisé à cette fin: le score est un indice de stabilité d'expression d'un gène de référence candidat comparé à tous les autres candidats.[343] ExpressionSuite est un programme qui permet d'analyser les données obtenues par qPCR en comparant les Cq d'un gène aux restes des candidats. Plus le score est petit, plus l'expression du gène est stable, relativement au reste des gènes candidats. Le gène de référence ayant le plus petit score a été choisi comme gène de référence pour la qPCR.

La stabilité des huit gènes de référence a été testée dans les cellules MCF-7 MDR ensemencées dans des plaques de 24 puits. Ces cellules ont été transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M (100 nM/puit), le chitosane libre ou avec les nanoparticules DharmaFECT/MDR1-siARN_2M (100 nM/puit) tel que décrit dans les sections 3.6 et 3.7. DharmaFECT a servi comme contrôle pour évaluer l'effet spécifique des systèmes de livraison sur la stabilité des gènes de référence. Les cellules non-transfectées ont aussi servi pour comparer l'effet spécifique du traitement sur la stabilité des gènes de référence. Pour chaque condition, les cellules de quatre puits ont été transfectées (ou non) puis incubées à 37°C pendant 24 heures avec le milieu de transfection (DMEM). Le milieu de transfection a été par la suite changé pour le milieu de culture (RMPI ou EMEM) et les cellules ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Par la suite, l'ARN total a été extrait, traité à la chitosanase, purifié, quantifié, analysé par Bioanalyzer et rétrotranscrit tel que décrit dans les sections 3.11.4 à 3.11.6. La **Figure 3.3** résume les étapes du test de stabilité.

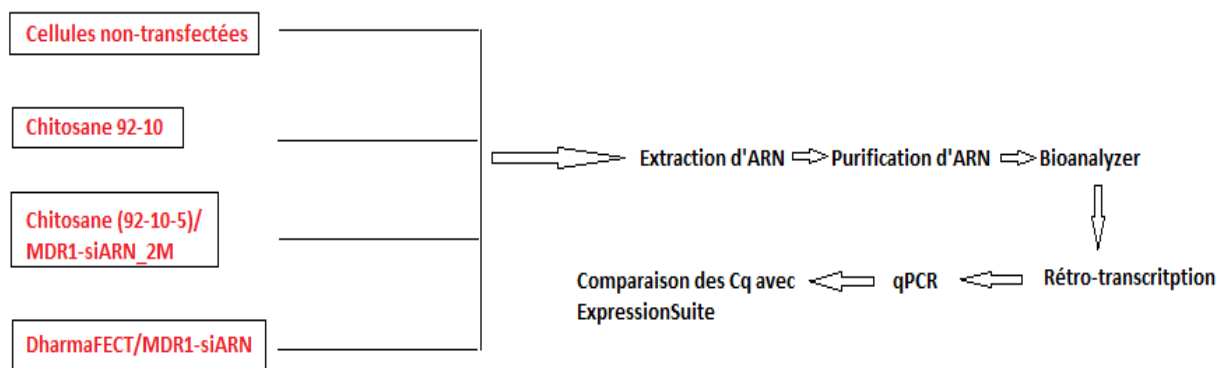


Figure 3.3 Le design expérimental pour déterminer le gène de référence à utiliser pour mesurer les variations de l'expression du gène MDR1 par qPCR. La comparaison des Cq a été effectuée par le logiciel ExpressionSuite afin d'attribuer à chacun des gènes un score correspondant à son indice de stabilité d'expression.

3.11.3 Transfection des cellules MCF-7 MDR

L'efficacité du silençage du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane 92-10/MDR1-siARN a été évaluée en quantifiant les ARNm, du gène MDR1, par des réactions d'amplification en temps réel (qPCR). Tout d'abord, les cellules MCF-7 MDR ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits puis transfectées avec les nanoparticules chitosane 92-10/MDR1-siARN, DharmaFect/MDR1-siARN ou le chitosane seul tel que décrit dans les sections 3.5.1, 3.6 et 3.7. De plus, quatre différents duplexes de siARN ont été testées (**Tableau 3.3**). Des cellules MCF-7 MDR non transfectées ont été utilisées comme calibrateur pour permettre une normalisation par le modèle de Livak. Aussi des cellules MCF-7 non transfectées ont été utilisées pour déterminer le niveau d'expression du gène MDR1 dans des cellules sensibles à la doxorubicine. Ensuite 48 heures après la transfection, les cellules ont été traitées à la chitosanase afin d'éliminer la présence de chitosane libre (section 3.11.4). Ce dernier doit être éliminé pour éviter une interférence avec l'extraction de l'ARN total. L'ARN total a été extrait puis purifié afin d'éliminer toute trace ADN génomique (section 3.11.5). Ensuite la qualité de l'ARN total extrait a été évaluée selon le rapport 28S/18S (ribosomal) en utilisant le "Agilent BioAnalyzer 2100" et l'ARN total a été quantifié par le test de ribogreen [6] tel que décrit dans les sections 3.11.5 et 3.11.6. Rappelons qu'il était important de quantifier et de déterminer l'intégrité de cet ARN afin d'assurer des résultats fiables lors de la qPCR (sections 3.11.6-

3.11.7). L'ARNm (1.0 µg) a été rétrotranscrit en ADNc (section 3.11.8) avant de procéder au qPCR (section 3.11.9). Rappelons que ces analyses par qPCR avaient d'abord nécessité une recherche poussée au niveau des gènes de références à utiliser. Le niveau d'expression du gène de référence choisi et du gène MDR1 a été étudié par multiplexe. L'étude a été menée selon le design expérimental présenté dans la **Figure 3.4**.

Tableau 3.3 Conditions de transfection des cellules MCF-7 MDR

Description	nbr	siARN (description des brins sens et antisens dans la section 3.1)	Système de livraison
Échantillons	1	siARN_1	Chitosane 92-10-5
	2	siARN_2	Chitosane 92-10-5
	3	siARN_1M	Chitosane 92-10-5
	4	siARN_2M	Chitosane 92-10-5
Contrôle négatif	6	-	Chitosane 92-10-5
Contrôle positif	7	siARN_1	DharmaFect1
	8	siARN_2	DharmaFect1
	9	siARN_1M	DharmaFect1
	10	siARN_2M	DharmaFect1
Calibrateur	11	Aucun traitement (pas de transfection)	

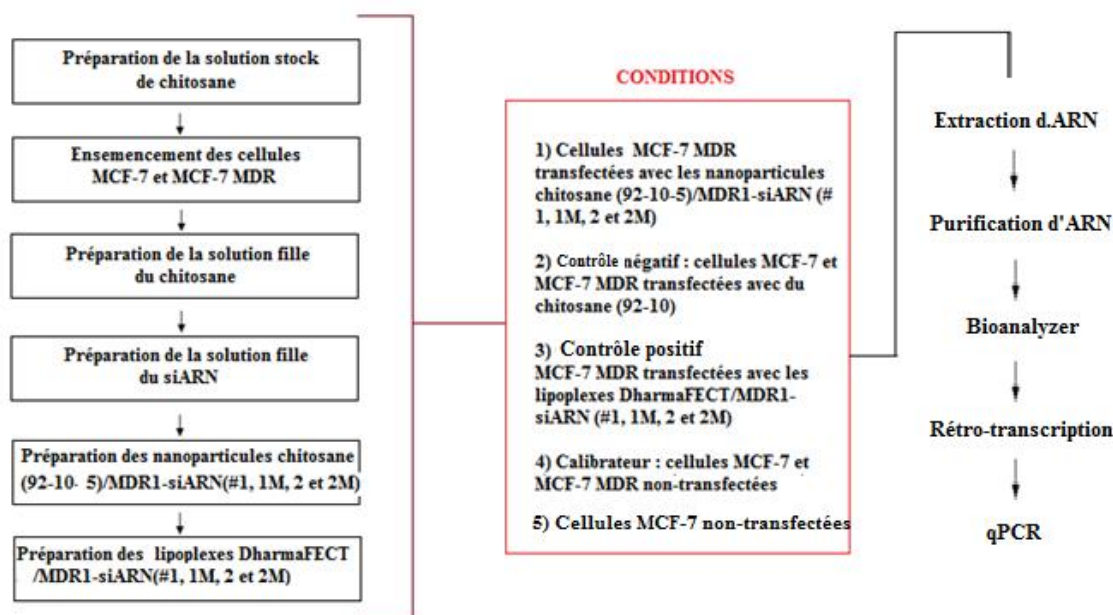


Figure 3.4. Le design expérimental pour déterminer l'efficacité du silençage du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane 92-10/MDR1-siARN

3.11.4 Traitement à la chitosanase

Afin d'améliorer le rendement d'extraction de l'ARN et l'intégrité de l'ARN extrait à partir des cellules traitées avec les nanoparticules chitosane/MDR1-siARN, nous avons eu recours à un traitement enzymatique impliquant la chitosanase type III. Cette méthode permet d'éliminer le chitosane libre présent dans les puits. Cette étape est importante, car le chitosane libre se lie à l'ARN et empêche un bon recouvrement lors du processus d'extraction de l'ARNm ou d'ARN totale.[272] Pour traiter les cellules d'un plateau de 24 puits, 11.9 mL de milieu DMEM (MES 5 mM, NaHCO₃ 10 mM, pH 6.5, sans sérum) a été mélangé avec 144 µL de chitosanase (9 mU/mL). Le milieu cellulaire (RPMI1640 pour les cellules MCF-7 MDR et EMEM pour les cellules MCF-7) a été aspiré du plateau et remplacé avec 500 µL du mélange préparé de DMEM et de chitosanase. Pour permettre l'action de l'enzyme, le plateau a été incubé pendant 60 minutes dans l'incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

3.11.5 Extraction de l'ARN total

Après traitement des cellules à la chitosanase, l'ARN total a été extrait des cellules en utilisant le RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon le protocole du manufacturier. [344] L'ARN obtenu a été ensuite purifié en utilisant le TURBO DNA-free™ Kit (Life Technologies) tel que décrit par le manufacturier.[345] Cette étape a permis l'élimination complète de l'ADN génomique en utilisant l'enzyme "Hyperactive TURBO DNase". Cette enzyme possède une activité 50 fois supérieure et une efficacité catalytique 350% plus grande que la DNaseI conventionnelle. Ces caractéristiques rendent la TURBO DNase plus efficace pour éliminer la contamination de l'ADN.

3.11.6 Quantification de l'ARN total

L'ARN total extrait a été quantifié en utilisant le test de quantification d'ARN «Quant-iT™ *RiboGreen*®» dans un environnement de travail exempt d'ARNase. Le réactif Ribogreen est un marqueur d'acides nucléiques ultra sensible permettant de quantifier l'ARN en solution. C'est un outil puissant capable de quantifier aussi peu que 200 pg d'ARN dans un échantillon de 200 µL de volume. Le Ribogreen a permis de remplacer la technique de quantification d'acides nucléiques la plus utilisée: la mesure de l'absorbance à 260 nm.

3.11.6.1 Préparation de la courbe standard

La courbe standard a été préparée en utilisant l'ARN ribosomal (ARNr) fourni avec le kit Quant-iT™ *RiboGreen*®. L'ARNr (100 µg/mL) a été diluée avec le tampon TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) de façon à obtenir cinq différentes concentrations (1, 0.5, 0.1, 0.02 et 0 µg/mL). Un volume de 100 µL des solutions a été transféré en triplicata dans un plateau noir de 96 puits à fond plat.

3.11.6.2 Préparation des échantillons

Les échantillons d'ARN totaux extraits des cellules non-transfectées, des cellules transfectées avec les nanoparticules, ou avec le chitosane libre ont été diluées 100 fois dans du tampon TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5). Ensuite, un volume de 100 µL de chaque échantillon d'ARN dilué a été transféré en triplicata dans les puits d'un plateau noir de 96 puits

3.11.6.3 Préparation de la solution de travail RiboGreen®

Le réactif RiboGreen® a été dilué 200 fois dans du tampon TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) puis 100 µL de cette solution diluée a été ajouté dans chacun des puits du plateau contenant les solutions à tester ou les standards.

3.11.6.4 Lecture de la plaque et analyse des données

Le plateau a été incubé pendant cinq minutes à température de la pièce puis la fluorescence a été mesurée par spectrométrie en utilisant un lecteur pour microplaque (Tecan Infinite M®200) à des longueurs d'onde excitation/émission de 485nm/535nm. Une courbe standard a été obtenue en associant une mesure de fluorescence pour chacune des concentrations du standard. Les concentrations d'ARN total des échantillons testés ont été calculées à partir de l'équation de la courbe standard.

3.11.7 Évaluation de l'intégrité de l'ARN total

L'évaluation de l'intégrité de l'ARN total isolé est nécessaire pour assurer une quantification fiable du silençage par qPCR. L'intégrité de l'ARN total extrait a été réalisée en utilisant le système Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada) à l'institut de recherche en immunologie et en cancérologie (IRIC).

Le fonctionnement du Bioanalyzer est basé sur le principe de l'électrophorèse capillaire durant laquelle les molécules d'ARN seront séparées selon leur taille: les particules les plus petites vont migrer plus rapidement. Des sondes moléculaires (fluorophores) sont utilisées pour former des complexes avec l'ARN détectable en induisant la fluorescence avec un laser. Les informations obtenues sont ainsi présentées sous forme de bandes de type gel et des pics d'électrophorèse.

La quantification totale d'ARN est réalisée en comparant l'aire sous les pics avec celui du marqueur. L'intégrité de l'ARN (RIN) est déterminée en calculant le ratio (18S et 28S). Le facteur d'intégrité de l'ARN (RIN) «RNA Integrity Number » est un outil puissant permettant d'estimer la pureté et l'intégrité d'un échantillon d'ARN. C'est un nombre qui varie entre 1 et 10, où 1 représente un échantillon d'ARN complètement dégradé, et 10 un ARN parfait. De plus, le RIN peut être utilisé pour comparer des échantillons d'ARN et pour assurer, par exemple, la reproductibilité d'une expérience.

Un volume de 1 μL de chaque échantillon d'ARN, préalablement dénaturé à 70°C pendant 10 minutes, a été chargé dans chaque puits d'une puce «Nano 600 kit». La puce a été vortexée à 2 400 rpm durant 1 minute et transférée dans l'appareil Bioanalyzer.

3.11.8 Rétrotranscription de ARN en ADNc

L'ARN total extrait des cellules a été rétrotranscrit en ADNc en utilisant le "SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit" (**Tableau 3.4**). Cette trousse a été utilisée pour synthétiser l'ADNc en utilisant une enzyme SuperScript® III RT qui est une version améliorée de la M-MLV RT, avec une meilleure stabilité thermique et une activité RNase H plus faible.[19, 198] C'est un kit qui permet la préparation d'ADNc à partir de l'ARN total avec un excellent rendement, peu importe le taux d'abondance du gène d'intérêt, ce qui améliore la gamme dynamique de la qRT-PCR.

Ainsi 1.0 μg d'ARN total a été utilisé dans un volume réactionnel final de 20 μL contenant le mélange de réaction 5X VILO™ et le mélange 10X SuperScript® Enzyme. Le mélange de réactions 5X VILO™ contient des amorces aléatoires « random » (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), du MgCl_2 , et des dNTP (1 mM) dans un tampon optimisé pour la qRT-PCR. Le mélange 10X SuperScript® Enzyme contient l'enzyme SuperScript® III RT (200 unités/ μL), la « RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor » (40 unités par 20 μL de mélange réactionnel) et une « proprietary helper protein ».

La réaction de transcription inverse a été effectuée dans un thermocycleur Rotorgene HRM 6000. Les échantillons ont été soumis à une température de 42°C pendant 60 minutes afin de promouvoir la synthèse du premier brin de l'ADNc. La synthèse a été arrêtée en incubant les mélanges à 85°C pendant 5 minutes.

Tableau 3.4 Composant et les volumes utilisés pour la réaction de transcription inverse d'un microgramme d'ARN total en ADNc en utilisant le kit "VILO Superscript Reverse transcription"

Composant	Volume (µL)
5X VILO Reaction Mix	4
10X SuperScript Enzyme Mix	2
ARN (1.0 µg)	X µL (jusqu'à 2 µL)
Eau certifiée sans nucléase	Ajuster pour un volume final de 20 µL

3.11.9 Amplification en temps réel (qPCR) du gène MDR 1

Pour effectuer la qPCR, la technologie Taqman expliquée dans la section 3.11.9.3.11.1, a été utilisée en raison de sa grande spécificité.

3.11.9.1 Préparation de la plaque

Une préparation minutieuse des plaques qPCR était nécessaire pour effectuer une réaction taqman. Il est à noter que des microtubes certifiés sans ADNase et sans ARNase ont été utilisés pour toutes les étapes menant à une analyse par qPCR. Dans chaque tube, 690 µL de réactif "TaqMan gene expression Master mix " (Life technologies), ayant une concentration 2X, ont été ajoutés aux 69 µL de l'ADNc (50 ng) provenant des cellules soumises à l'une conditions décrites précédemment. Le réactif "TaqMan gene expression Master mix" contient une polymérase ultrapure "AmpliTaq Gold® DNA Polymerase", une glycosylase Uracil-ADN(UDG), des désoxyribonucléotide triphosphates (dNTPs) avec de la désoxyuridine triphosphate (dUTP), du ROX™ Passive Reference, et des composants tampons optimisés pour la sensibilité, la précision, la spécificité et pour la complexation ("duplexing").

Les tubes ont été, par la suite, vortexés pendant 5 secondes et centrifugés pendant 10 secondes à 13 000 rpm. Un volume de 11 µL du mélange a été transféré dans les puits d'une plaque de 96 puits (Corning 96 well plate tissue culture sterile, Fisher, Product N°10-126-37). La plaque a été centrifugée à 2000 rpm pendant 5 secondes afin d'éliminer les bulles. La plaque a été ensuite scellée et placée à 4°C. Une autre série de tubes certifiés sans nucléase a été identifiée par le nom

du (des) gène(s) de référence et un tube par le nom du gène cible (MDR1). Dans chaque tube, 276 μL d'eau certifié sans nucléase ont été mélangés avec 34.5 μL des amorces-sondes spécifique aux gènes de référence ou au gène MDR1 et le tout a été vortéxé pendant 15 secondes. Les tubes ont été par la suite centrifugés à 13 000 rpm pendant 30 secondes. Enfin, 9 μL du contenu de chaque tube ont été ajoutés dans les puits correspondants de la plaque tel qu'illustré dans la **Figure 3.5** pour l'expérience servant à déterminer le gène de référence à utiliser ou tel qu'illustré dans la **Figure 3.6** pour les expériences servant à déterminer le silençage du gène MDR1. Notons que les expériences qPCR ont été réalisées en monoplexe, c'est-à-dire qu'il y avait un seul type de sonde, spécifique à un gène, par puits.

Condition	Cellules non-traitées				CS				CS-siARN				Dharma FECT						
	# Puits				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	B	Ref#1		vide		Ref#1		vide		Ref#1		vide		Ref#1		vide			
C	D	Ref#2		vide		Ref#2		vide		Ref#2		vide		Ref#2		vide			
E	F	Ref#3		vide		Ref#3		vide		Ref#3		vide		Ref#3		vide			
G	H	Ref#4		vide		Ref#4		vide		Ref#4		vide		Ref#4		vide			
I	J	Ref#5		vide		Ref#5		vide		Ref#5		vide		Ref#5		vide			
K	L	Ref#6		vide		Ref#6		vide		Ref#6		vide		Ref#6		vide			
M	N	Ref#7		vide		Ref#7		vide		Ref#7		vide		Ref#7		vide			
O	P	Ref#8		NTC		Ref#8		NAC		Ref#8		NRTC		Ref#8		vide			

Figure 3.5 Design de la plaque 96 puits pour l'expérience de qPCR afin d'étudier la stabilité de huit gènes de référence. La stabilité des gènes a été étudiée dans différentes conditions cellules non-transfectées, cellules transfectées avec du chitosane 92-10 seul (CS), avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)MDR1siRNA_2M (CS-siARN) et avec le DharmaFECT-MDR1siRNA_2M (DharmaFect). "NTC" ("no template contrôle") correspond au contrôle ne contenant pas d'ADNc. Le contrôle "sans polymérase" ou "no amplification contrôle" (NAC) ne contient pas la polymérase, et celui "sans ADNc et sans polymérase" ou "no reverse transcriptase contrôle" (NRTC) ne contient pas l'enzyme reverse transcriptase ni l'ADNc.

	POLR2A								MDR1											
# puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A	Cellules MCF-7 MDR non-traitées								Cellules MCF-7 MDR non-traitées								NTC			
B	CS 92-10								CS 92-10								NAC			
C	CS (92-10-5)/MDR1-siARN_1								CS (92-10-5)/MDR1-siARN_1								NTCC			
D	DharmaFECT/MDR1-siARN_1								DharmaFECT/MDR1-siARN_1								VIDE			
E	Cellules MCF-7 MDR non-traitées								Cellules MCF-7 MDR non-traitées								VIDE			
F	CS 92-10								CS 92-10								VIDE			
G	CS (92-10-5)/MDR1-siARN_1M								CS (92-10-5)/MDR1-siARN_1M								VIDE			
H	DharmaFECT/MDR1-siARN_1M								DharmaFECT/MDR1-siARN_1M								VIDE			
I	Cellules MCF-7 MDR non-traitées								Cellules MCF-7 MDR non-traitées								VIDE			
J	CS 92-10								CS 92-10								VIDE			
K	CS (92-10-5)/MDR1-siARN_2								CS (92-10-5)/MDR1-siARN_2								VIDE			
L	DharmaFECT/MDR1-siARN_2								DharmaFECT/MDR1-siARN_2								VIDE			
M	Cellules MCF-7 MDR non-traitées								Cellules MCF-7 MDR non-traitées								VIDE			
N	CS 92-10								CS 92-10								VIDE			
O	CS (92-10-5)/MDR1-siARN_2M								CS (92-10-5)/MDR1-siARN_2M								VIDE			
P	DharmaFECT/MDR1-siARN_2M								DharmaFECT/MDR1-siARN_2M								VIDE			

Figure 3.6 Design de la plaque 96 puits pour déterminer par qPCR le silençage du gène MDR1 en utilisant le gène de référence sélectionné POLR2A. "NTC" ("no template contrôle") correspond au contrôle ne contenant pas d'ADNc. Le contrôle "sans polymérase" ou "no amplification contrôle" (NAC) ne contient pas la polymérase, et celui "sans ADNc et sans polymérase" ou "no reverse transcriptase contrôle" (NRTC) ne contient pas l'enzyme reverse transcriptase ni l'ADNc.

La plaque a été scellée avec un film adhésif transparent et centrifugé à 2000 rpm pendant 5 minutes pour éliminer les bulles d'air et pour s'assurer que les sondes, amorces, les réactifs et l'ADNc ont bien été mélangés. Les plaques ont été placées dans l'appareil 7900HT Fast Real Time PCR System de Applied Biosystem et la réaction qPCR a été lancée par le logiciel Vii7.[345] La réaction qPCR consiste en une première étape qui dure 2 minutes à 50°C (étape nécessaire pour une activité enzymatique optimale de l'UNG), une deuxième à 95°C durant 10 minutes permettant d'activer l'enzyme Taq polymérase et une troisième étape, composée de 40 cycles dont chacun est divisé en 15 secondes à 95°C pour la dénaturation et 60 secondes à 60°C pour l'appariement des amorces et sondes et l'amplification de l'ADN. Il est à noter que l'enzyme UNG (AmpErase® uracil-N-glycosylase (UNG) (P/N N808-0096)) est un composant important du "TaqMan gene expression Master mix" permettant de prévenir la ré-amplification des produits PCR "carryover" en enlevant les uraciles incorporés dans les brins d'ADN simple ou double brin.[346]

3.11.9.1.1 Contrôles négatifs

Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats de la qPCR, de nombreux contrôles ont dû être prévus tels que :

1. Un contrôle "sans ADNc" ou "no template contrôle" (NTC), ne contenant pas d'ADNc, a été utilisé afin de détecter toute contamination. Ce contrôle a été le dernier échantillon pipeté dans la plaque.
2. Un contrôle "sans polymérase" ou "no amplification contrôle" (NAC), ne contenant pas la polymérase, a été utilisé pour vérifier s'il y a dégradation de la sonde.
3. Un contrôle "sans ADNc et sans polymérase" ou "no reverse transcriptase contrôle" (NRTC), ne contenant pas l'enzyme reverse transcriptase ni l'ADNc a été utilisé pour vérifier toute contamination et la spécificité de la réaction.

3.12 Test de cytotoxicité des nanoparticules et resensibilisation des cellules MCF-7 MDR à la doxorubicine

Un des objectifs importants de ce projet consiste à resensibiliser les cellules MCF-7 MDR à la doxorubicine. Pour resensibiliser ces cellules, il fallait d'abord réduire de façon spécifique l'expression la protéine P-gp, par la transfection des cellules avec les nanoparticules chitosane

(92-10-5/MDR1-siARN. Afin de déterminer l'efficacité de la réduction de la protéine P-gp et la resensibilisation des cellules, les cellules transfectées ont été soumises à un traitement à la doxorubicine. Si la transfection avec les nanoparticules préalablement au traitement à la doxorubicine permet d'augmenter la mortalité des cellules MCF-7 MDR, il est possible d'affirmer que l'expression de la protéine P-gp a été altérée et que les cellules ont été resensibilisées. Cependant, afin de s'assurer que la mortalité observée est directement causée par doxorubicine, il fallait tout d'abord évaluer la toxicité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN.

L'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules a été réalisée en utilisant le bleu alamar (AlamarBlue®). Le bleu alamar fonctionne comme un indicateur de la viabilité des cellules en mesurant le pouvoir de réduction de celles-ci. Le cytosol des cellules vivantes est un environnement réducteur. La résazurine est l'ingrédient actif du bleu alamar, il est non toxique, perméable aux membranes cellulaires, de couleur bleu et non fluorescent. Lorsque la résazurine (forme oxydée) pénètre dans une cellule vivante, elle est réduite en résorufine. La résorufine est un produit rouge et fluorescent qui peut être mesuré par colorimétrie (**Figure 3.7**). Il y a donc une augmentation de la fluorescence et de la couleur rouge en fonction de la réduction du bleu alamar et de la viabilité des cellules. Ainsi, des lectures d'absorbance à 570 et 600 nm par spectrométrie ont été effectuées afin de calculer le pourcentage de réduction du bleu alamar et pour conclure le pourcentage de mortalité/survie cellulaire.

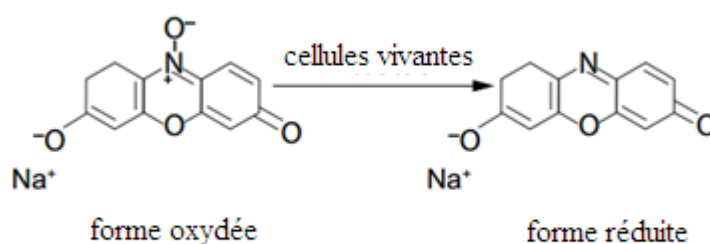


Figure 3.7 Réaction de réduction dans les cellules vivantes de la forme oxydée du bleu alamar (résazurine) en une forme réduite (résorufine).

3.12.1 Détermination du nombre de cellule à ensemercer et le temps d'incubation avec le bleu alamar

La durée d'incubation avec le bleu alamar ainsi que le nombre de cellules ensemençées sont deux variables qui peuvent influencer les résultats des tests de cytotoxicité. Des pré-tests ont donc été réalisés afin de fixer ces deux variables pour chaque lignée cellulaire utilisée.

Les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR ont été ensemençées dans une plaque de 96 puits à différentes quantités (0, 2000, 5000, 10 000, 20 000, 30 000, 40 000 et 50 000 cellules/puits) et incubées pendant 24 heures à 37°C et 5% de CO₂. Ensuite, le milieu a été aspiré des puits et 100 µL/puits de bleu alamar dilué 1 :10 dans du milieu de culture, a été ajouté sur les cellules. La viabilité cellulaire a été déterminée après 1, 2, 3, 4, 5 et 24 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO₂. L'absorbance des surnageant a été mesuré par spectrométrie en utilisant l'appareil Infinite 200 à des longueurs d'onde de 570nm et 600nm (longueur d'onde de référence). Des puits, sans cellules et avec le milieu de culture, ont été utilisés comme contrôle négatif.

Un premier graphique représentant la réduction du bleu alamar en fonction du temps d'incubation pour les différentes densités de cellules ensemençées. Il a été tracé afin de déterminer le nombre de cellules dont la croissance est proportionnelle (linéaire) à la réduction du bleu alamar. Un deuxième graphique, présentant la réduction du bleu alamar en fonction de la densité cellulaire pour les différents temps d'incubation avec le bleu alamar, a été préparé. Ceci a permis d'identifier le temps d'incubation maximal avec le bleu alamar où la réduction du bleu alamar est linéaire, peu importe la quantité de cellules ensemençées.

La réduction du bleu alamar a été calculée selon l'équation suivante en utilisant les coefficients d'extinction molaire du bleu alamar présentés dans le **Tableau 3.5** :

% réduction de l'alar blue =

$$\frac{\text{Conc. de la forme réduite de l'Alamar Bleu dans le PUIITS TESTÉ}}{\text{Conc. de la forme oxydée dans le PUIITS CONTRÔLE NÉGATIF}} = \frac{\sum_{oxy}(600nm) \cdot A(560nm) - \sum_{oxy}(560nm) \cdot A(600nm)}{\sum_{red}(560nm) \cdot A(600nm) - \sum_{red}(600nm) \cdot A(560nm)} \cdot 100$$

Tableau 3.5 Coefficient d'Extinction Molaire du bleu alamar

Longueur d'onde (λ)	ϵ_{RED}	ϵ_{OX}
540 nm	104.395	47.619
570 nm	155.677	80.586
600 nm	14.652	117.216
630 nm	5.494	34.798

Ces tests étaient importants, car ils ont permis de déterminer: (1) le temps d'incubation maximale avec le bleu alamar pour une densité de cellule donnée, et (2) la gamme de la densité cellulaire pour laquelle il y a une réponse linéaire reliant le nombre de cellules à la réduction du bleu alamar pour un temps d'incubation donné.

Parallèlement aux tests de cytotoxicité avec le bleu alamar, un comptage cellulaire à l'hémacytomètre a été effectué à l'aide d'une coloration au bleu de trypan. Le bleu de trypan, un colorant azoïque, permet de distinguer les cellules vivantes et mortes en colorant uniquement les cellules mortes en bleu. Ce comptage cellulaire permet d'assurer, pour les tests suivants, que la quantité de cellules vivantes dans les puits s'inscrit dans la fourchette acceptable prédéterminée pour une évaluation fiable de la cytotoxicité par le test de l'alarmar bleu.

3.12.2 Identification de IC₅₀ de la doxorubicine

Afin d'identifier la concentration de doxorubicine qui mène à 50% de mortalité chez les cellules MCF-7 et/ou MDF-7 MDR, 10 000 cellules ont étéensemencées par puits dans une plaque 96 puits dans leur milieu de culture correspondant (EMEM pour les cellules MCF-7 et RPMI pour les MCF-7 MDR). Après une incubation de 24h à 37°C et 5% CO₂, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais puis les cellules ont été incubées durant 48 heures dans les mêmes conditions. Ensuite de nouveaux milieux de culture ont été préparés contenant chacun différentes concentrations de doxorubicine : les cellules MCF-7 ont été incubées avec 0, 0.008, 0.5, 1, 10, 20, 25, 30 et 50 nM de doxorubicine, et les cellules MCF-7 MDR ont été incubées avec 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8.6 μM de doxorubicine pendant 48 heures dans un incubateur à 37°C contenant 5% CO₂. Après 48 heures, les milieux de culture ont été remplacés par de nouveaux contenant 10% de bleu alamar et les cellules ont été incubées pendant 4 heures dans

un incubateur à 37°C contenant 5% CO₂. Après 4 heures, l'absorbance des milieux contenus dans les puits a été mesurée à 570 nm (en utilisant une longueur d'onde de référence de 600 nm). Grâce aux données obtenues pour chacune des lignées cellulaires, un graphique a été tracé pour montrer la survie cellulaire (%) en fonction de la concentration de doxorubicine (nM pour les cellules MCF-7 et µM pour les cellules MCF-7 MDR). Une valeur de viabilité cellulaire de 100% a été attribuée aux cellules dont le milieu de culture ne contenait pas de doxorubicine. La concentration de doxorubicine qui réduisait le nombre de cellules viables à 50% après 48 h d'exposition (IC₅₀) a été déduite à partir des données du graphique.

3.12.3 Test de toxicité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN

Dans le but de vérifier la toxicité des nanoparticules chitosane 92-10, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M, DharmaFECT/MDR1-siARN_1, DharmaFECT/MDR1-siARN_1M, DharmaFECT/MDR1-siARN_2 et DharmaFECT/MDR1-siARN_2 M, les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR ont étéensemencées dans une plaque 96 puits selon une densité de 10 000 cellules par puits. Le lendemain, les cellules ont été transfectées tel que décrit dans la section 3.6 et 3.7 avec les nanoparticules puis incubé durant 48 heures à 37°C et 5% CO₂. Ensuite, la viabilité cellulaire a été mesurée par test au bleu alamar tel que décrit dans la section 3.12.1. Les cellules non-traitées ont été utilisées comme contrôle négatif.

3.12.4 Test de resensibilisation à la doxorubicine des cellules MCF-7 MDR pré-traitées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN

Afin de vérifier si le silençage du gène MDR1 était suffisant pour inverser la résistance des cellules MCF-7 MDR aux chimiodrogues, en particulier à la doxorubicine, les cellules MCF-7 MDR ont été transfectées avec les nanoparticules tel que décrit dans la section précédente. Après 48 heures, le milieu de culture a été changé pour un milieu frais contenant la concentration de doxorubicine correspondant au IC₅₀. Ensuite, 48 heures après l'ajout de la doxorubicine, le milieu de culture a été encore une fois changé pour un milieu contenant 10% de bleu alamar et la plaque a été incubée pendant 4 heures dans un incubateur à 37°C contenant 5% CO₂. La viabilité cellulaire a été déterminée via une lecture de l'absorbance à 570 nm (avec une longueur d'onde de référence de 600 nm).

3.13 Analyses statistiques

Tous les résultats obtenus ont été analysés avec le logiciel SigmaPlot 12.0 afin de pouvoir déterminer lesquels sont statistiquement significatifs. Les expériences ont été réalisées deux ou trois fois (N=2 ou 3), et chaque condition a été testée en triplicata ou en quadruplicat (n=3 ou 4) dans le but d'assurer la reproductibilité des résultats. Les résultats ont été exprimés sous formes d'une moyenne \pm l'écart-type. Afin de déterminer s'il y a une différence significative entre les moyennes de trois ou plusieurs groupes indépendants l'un de l'autre, le test d'analyse de variance ANOVA à un seul facteur ("One Way ANOVA") a été fait suivi du test post-hoc de Tukey. Les résultats sont jugés significatifs quand "p" est inférieur à 5% (0.05), où "p" est la probabilité que les groupes testés ne soient pas différents.

CHAPITRE 4 RÉSULTATS

4.1 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules chitosane 92-10 /MDR1-siARN : Détermination de la taille, du potentiel zêta (ζ) et de la polydispersité (pdl)

Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules chitosane/MDR1-siARN ont été étudiées en mesurant leur potentiel zêta et leur taille. Ces caractéristiques sont indicatrices de la stabilité des nanoparticules et du pouvoir protecteur offerts par le chitosane envers le siARN contre les nucléases. Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules chitosane/MDR1-siARN permettront d'évaluer l'efficacité du chitosane à jouer le rôle d'un système de livraison des MDR1-siARN.

Sachant que la membrane cellulaire est chargée négativement, il est nécessaire que les nanoparticules soient chargées positivement, et qu'elles aient un diamètre plus petit que 150 nm afin de pouvoir se lier puis traverser facilement la double membrane cellulaire. [347, 348] Les nanoparticules doivent aussi avoir diamètre plus grand que 15 nm pour éviter l'élimination rénale lors d'une administration *in vivo*. [349, 350] En résumé, les nanoparticules chitosane-siARN, doivent avoir une taille comprise entre 68 et 129 nm, un potentiel zêta positif approximatif de 20 mV et une polydispersité plus petite que 0.3. [347, 348] Dans le but de déterminer la grandeur et la charge de la surface des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN en solution, le potentiel zêta, la taille et la polydispersité (PdI) ont été mesurés en utilisant l'appareil Zetasizer Nano Zs par des techniques de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les résultats présentés dans le **Tableau 4.1** montrent que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1siARN_2 et chitosane (92-10-5)/MDR1siARN_2M possèdent respectivement un potentiel zêta de 19.8, 17.4, 23.5 et 21.7 mV, une taille de 82.29, 72.58, 82.72 et 62.56 nm et une polydispersité de 0.23, 0.21, 0.22 et 0.17. Les résultats obtenus par DLS (taille, potentiel zêta et PdI) montrent que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN ont des tailles, des potentiels zêta et des polydispersités recherchés pour permettre une transfection efficace *in vitro* et *in vivo*.

Tableau 4.1 Taille, potentiel zêta et polydispersité (PdI), obtenus par des techniques de diffusion dynamique de lumière (DLS), pour les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2 et chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M.

siARN	Chitosane	Taille (nm)	PdI	Potentiel Zêta (mV)
MDR1siARN_1	92-10-5	82.29 ± 0.7	0.23 ± 0.004	+19.8 ± 0.06
MDR1siARN_1M	92-10-5	72.58 ± 0.5	0.21 ± 0.013	+17.4 ± 2.6
MDR1siARN_2	92-10-5	82.72 ± 0.9	0.22 ± 0.003	+23.5 ± 2.9
MDR1siARN_2M	92-10-5	62.56 ± 0.5	0.17 ± 0.015	+21.7 ± 2.11

4.2 Internalisation des nanoparticules chitosane 92-10 /si siGLOTM dans les cellules MCF-7 MDR

Cette expérience avait pour but de démontrer, par microscopie confocale, la capacité des nanoparticules à traverser la membrane cytoplasmique des cellules MCF-7 MDR. Grâce à la microscopie confocale et à l'utilisation de siARN et de chitosane marqués par des fluorochromes, il est possible de localiser les composantes des nanoparticules dans une culture cellulaire. Le suivi du chitosane et du siARN marqués est possible grâce à l'émission d'une fluorescence suite à l'excitation, par un laser, des fluorochromes à une longueur d'onde bien précise. Cette fluorescence est détectée par un photomultiplicateur qui permet de générer l'image.

Le chitosane et le siGLOTM ont été marqués respectivement par la Rhodamine et le 6-FAM. L'émission de la fluorescence du chitosane correspond à la couleur rouge alors que celle des siGLOTM est associée au vert. Ces expériences en microscopie confocale ont été réalisées afin d'étudier le pouvoir des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siGLOTM à traverser la membrane cytoplasmique des cellules MCF-7 MDR, et pour étudier la capacité du siGLOTM à se libérer du chitosane une fois les nanoparticules acheminées au niveau du cytosol. Les complexes chitosane-siGLOTM sont reconnaissables par leur couleur jaune provenant de la superposition des couleurs

lumières rouge (chitosane) et du vert (siGLOTM). Les résultats obtenus par microscopie confocale des cellules MCF-7 MDR 24 heures après transfection prouvent que le chitosane (92-10) possède le pouvoir de livrer le siGLOTM à l'intérieur de la cellule (**Figure 4.1**). Ceci est expliqué par la fluorescence observée dans le cytosol montrant que les siGLOTM (vert) se trouvent dans le cytosol de la cellule et ont été séparés du chitosane (rouge). On remarque aussi la présence de nanoparticules (jaune) à l'extérieur et à l'intérieur des cellules. Ces résultats font preuve du pouvoir du chitosane à jouer le rôle d'un système de livraison des siARN dans les cellules MCF-7 MDR.

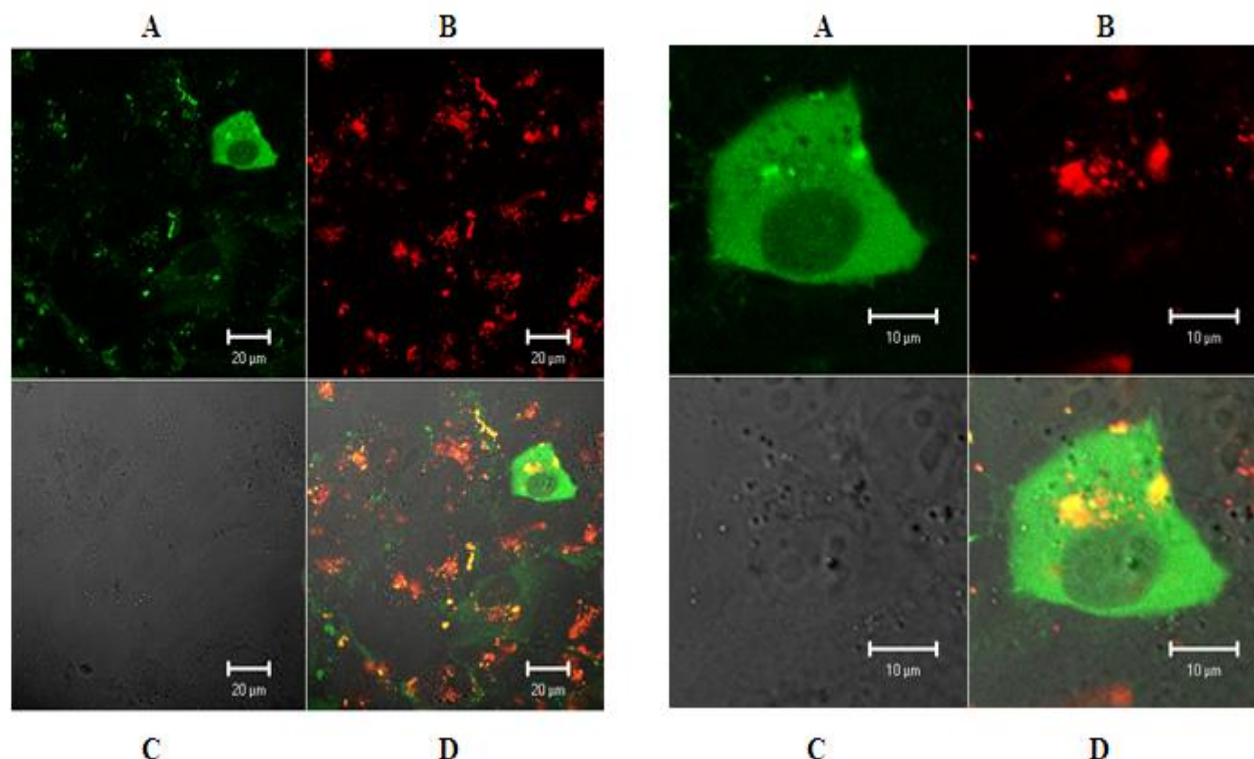


Figure 4.1 Observation par microscopie confocale de l'internalisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siGLOTM dans les cellules MCF-7 MDR et de la dissociation des siGLOTM des chitosanes dans l'espace intracellulaire. Les cellules MCF-7 MDR ont été transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siGLOTM et ont été observées 24 heures plus tard par microscopie confocale. Le quadrant de gauche est formé d'images confocales d'un plan élargi des cellules. Le quadrant de droite est composé d'images focalisées sur la cellule fortement transfectée. A) Détection du 6-FAM pour localiser les siGLOTM (en vert) B) Détection de la Rhodamine pour localiser le chitosane (Rouge. D) Superposition des émissions des fluorescences obtenues en A) et B). La couleur jaune est causée par l'addition des signaux de la Rhodamine (rouge) et 6-FAM (vert) et correspond aux nanoparticules chitosane (92-10-5)/ siGLOTM. C) Image des cellules sans la détection de fluorescence.

4.3 Vérification du pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN

Les résultats en microscopie confocale ont démontré que les nanoparticules chitosane/siARN peuvent s'internaliser dans les cellules MCF-7 MDR et libérer les siARN. La prochaine expérience avait donc pour objectif de confirmer que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN peuvent transfecter efficacement des cellules et «silencer» un gène marqueur. Cette

expérience sert ainsi de contrôle positif pour l'entièreté du projet de recherche. Le pouvoir de transfection des nanoparticules a été déterminé en mesurant le niveau d'expression de la protéine eGFP dans des cellules H1299 eGFP⁺ non transfectées comparativement à celles transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN. La fluorescence de la protéine eGFP a été mesurée par cytométrie en flux (FACS). Cette mesure a permis de déterminer le niveau d'expression de la protéine eGFP et ainsi le pouvoir de transfection des nanoparticules à base de chitosane 92-10. Les résultats bruts obtenus par FACS sont présentés dans les figures en annexe 1 et les pourcentages de silençage du gène eGFP⁺ sont résumés dans le **Tableau 4.2**. Les cellules non-transfectées agissent comme une référence avec un silençage fixé à 0%. Le pourcentage de silençage obtenu pour les cellules transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN est de 40%, tandis qu'il est de 79% pour les cellules transfectées avec les nanoparticules DharmaFECT/eGFP-siARN (contrôle positif). Le chitosane (92-10) seul montre une réduction négligeable de l'expression avec un silençage non statistiquement significatif de 4%. Tel qu'attendu, aucun silençage n'est observé pour les cellules transfectées avec des nanoparticules à base de chitosane et de siARN leurre (c.-à-d.. spécifique à aucun gène de la cellule).

Tableau 4.2 Silençage obtenu et attendu du gène eGFP⁺ (%) après transfection des cellules H1299 eGFP⁺ avec le chitosane 92-10, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN, DharmaFECT/eGFP-siARN et chitosane (92-10-5)/siARN leurre

	Silençage du gène eGFP ⁺ (%)	Silençage attendu du gène eGFP ⁺ (%) [*]
NT	0	0
CH	4 ± 1.2	0-10
chitosan (92-10-5)/eGFPsiARN	40 ± 0.5	40-55
DharmaFECT-eGFPsiARN	79 ± 2.3	60-80
CS(92-10-5)/eGFPsiARN leurre	0 ± 0.6	0-10

* Les valeurs du « silençage » attendu du gène eGFP⁺ proviennent d'une série d'expériences réalisées dans nos laboratoires (données non publiées).

4.4 Confirmation de la présence d'ARNm spécifique au gène MDR1 par RT-PCR

Nous avons démontré clairement que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN pouvaient réduire l'expression du gène eGFP dans les cellules H1299 eGFP⁺. Ainsi, nous étions en mesure de croire que les nanoparticules à base de chitosane 92-10 et formées de siARN spécifiques au gène MDR1 peuvent transfecter des cellules MCF-7 MDR et réduire l'expression du gène MDR1 responsable de la résistance des cellules MCF-7 MDR aux chimiodrogues. Toutefois avant d'entreprendre le silençage du gène MDR1, il était primordial de confirmer la présence de ce gène dans les cellules MCF-7 MDR. Cette confirmation a été effectuée par une réaction RT-PCR suivie d'un séquençage. Le séquençage du gène MDR1 à partir des cellules MCF-7 MDR était crucial pour s'assurer que gène était exempt de mutations qui pourraient compromettre la complémentarité des siARN-MDR1.

4.4.1 Amplification du gène (en partie) MDR1 par RT-PCR.

Afin de vérifier la présence de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR, l'ARN total a été extrait, quantifié puis analysé à l'aide du Bioanalyzer. Ensuite l'ARN total a été rétrotranscrit en ADNc. L'amplification d'une partie du gène MDR1 a été réalisée par PCR en utilisant l'ADNc et des amorces propres au gène MDR1.

4.4.1.1 Analyse des amplicons sur gel d'agarose

L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, après coloration au bromure d'éthidium, du produit amplifié par PCR montre un fragment d'ADN de 1100 pb qui correspond à taille théorique du fragment du gène MDR1 (**Figure 4.2**).

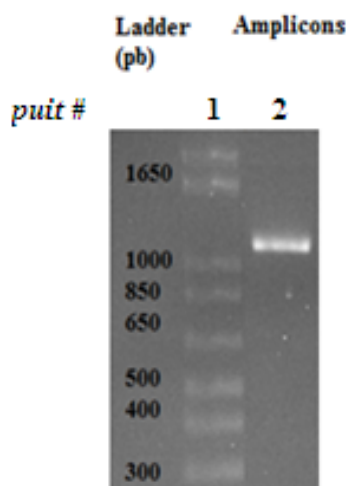


Figure 4.2 Profil électrophorétique du fragment obtenu suite à l'amplification d'une partie du gène MDR1 des cellules MCF-7 MDR. L'ARN total a été extrait des cellules MCF-7 MDR en utilisant le RNeasy Mini Kit, analysé par Bioanalyzer et rétro-transcrit en utilisant le Superscript VILO kit. L'ADNc produit a été utilisé comme matrice et le couple d'amorces (forward (5' AAGCCAGAACATTCCTCCTG 3') et reverse (5' GACAGCAGCTGACAGTCCAA 3')) a été utilisé afin de confirmer, par PCR, la présence du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR1. Le produit PCR obtenu a été analysé par migration sur gel d'agarose 1000 (2%). Le marqueur de poids moléculaire 1 kb plus (puits #1) permet d'estimer la taille des amplicons à 1100 pb (puits #2).

4.4.1.2 Séquençage par électrophorèse capillaire des amplicons

La présence du gène MDR1 dans les cellules MCF7-MDR a été confirmée par une PCR suivie du séquençage, par la méthode de Sanger, des amplicons purifiés.

La méthode de Sanger se base sur la polymérisation de l'ADN par l'emploi d'amorces complémentaires à la séquence d'ADN à séquencer, de quatre types de désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dTTP et dGTP), quatre types de didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) qui vont arrêter l'élongation, et d'une ADN polymérase responsable de l'élongation de l'amorce. Des fragments ainsi synthétisés ont été détectés en incorporant un traceur fluorescent attaché aux didésoxyribonucléotides. Les séquences obtenues par séquençage ont été comparées à la séquence enregistrée (Référence NCBI de la séquence : NM_000927) à l'aide du programme BioEdit. La **Figure 4.3**, correspond à une partie de la séquence codant pour le gène MDR1. Les acides nucléiques en rose correspondent aux régions de l'amplicon séquencées qui sont 100% homologues au gène MDR1.

```

AAACACTTGTATTACCATTTTTAAAGGCTATCATTACTCTTTACCTGTGAAGAGTAGAACATGAAGAAATC
TACTTTATTTCAGATATTCTCCAGATTCTTAAAGATTAGAGATCATTCTCATTCTCCTAGGAGTACTCAC
TTCAGGAAGCAACCAGATAAAAGAGAGGTGCAACGGGAGCCAGAACATTCCCTCCTGGAAATTCAACCTGT
TTCGCAGTTTCGAGGAATCAGCATTCACTCAATCCGGGCCGGGAGCAGTCATCTGTGGTGAGGCTGAT
TGGCTGGGCAGGAACAGCGCCGGGGCGTGGGCTGAGCACAGCCGCTTCGCTCTCTTTGCCACAGGAAGCC
TGAGCTCATTTCGAGTAGCGGCTCTTCCAAGCTCAAAGAAGCAGAGGCCGCTGTTTCGTTTCCTTTAGGTCT
TTCCACTAAAGTCGGAGTATCTTCTTCCAAAATTTACAGTCTTGGTGGCCGTTCCAAGGAGCGCGAGGTC
GGAATGGATCTTGAAGGGGACCGCAATGGAGGAGCAAAGAAGAAGAACTTTTTTAAACTGAACAATAAAA
GTGAAAAAGATAAGAAAGGAAAAAGAAACCAACTGTCACTGTATTTCAATGTTTCGCTATTCAAATTGGCT
TGACAAGTTGTATATGGTGGTGGGAACTTTGGCTGCCATCATCCATGGGGCTGGACTTCCTCTCATGATG
CTGGTGTTTGGAGAAATGACAGATATCTTTGCAAATGCAGGAAATTTAGAAGATCTGATGTCAAACATCA
CTAATAGAAGTGATATCAATGATACAGGGTTCTTCATGAATCTGGAGGAAGACATGACCAGGTATGCCTA
TTATTACAGTGGAAATTGGTGCTGGGGTGCTGGTTGCTGCTTACATTCAGGTTTCATTTTGGTGCCTGGCA
GCTGGAAGACAAATACACAAAATTAGAAAACAGTTTTTTTCATGCTATAATGCGACAGGAGATAGGCTGGT
TTGATGTGCACGATGTTGGGGAGCTTAACACCCGACTTACAGATGATGTCTCCAAGATTAATGAAGGAAT
TGGTGACAAAATTGGAATGTTCTTTTCAGTCAATGGCAACATTTTTCACCTGGGTTTATAGTAGGATTTACA
CGTGGTTGGAAGCTAACCCTTGTGATTTTGGCCATCAATCCTGTTCTGGACTGTCAGCTGCTGCTGGG
CAAAGATACTATCTTCATTTACTGATAAAGAACTCTTAGCGTATGCAAAGCTGGAGCAGTAGCTGAAGA
GGTCTTGGCAGCAATTAGAAGTGTGATTGCATTTGGAGGACAAAAGAAAGAACTTGAAAGGTACAACAAA
AATTTAGAAGAAGCTAAAAGAATTGGGATAAAGAAAGCTATTACAGCCAATATTTCTATAGGTGCTGCTT

```

Figure 4.3 Fragment de l'ARNm du gène MDR1 qui a été amplifié et séquencé et qui est homologue à la séquence publiée (NCBI Reference Sequence: NM_000927.4). Les encadrés noirs correspondent aux amorces forward et reverse utilisées pour la réaction PCR et le séquençage. La séquence en gras correspond à la région ciblée par les siARN utilisés dans ce projet.

4.5 Évaluer, par qPCR, le silençage du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules à base de chitosane.

La qPCR, "real-time Polymerase Chain Reaction" ou "réaction en chaîne par polymérase en temps réel", est une technologie basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR et qui est mesurée à chacun des cycles. Pour ce projet, la technologie Taqman a été utilisée et implique des sondes liées à des fluorochromes et spécifiques à une partie

de la séquence du gène MDR1 amplifié. Lors de la qPCR, plus il y a de matrices (c.-à-d. d'ADNc-MDR1) provenant de la rétrotranscription de l'ARN), moins élevé sera le Cq (cycle de quantification). Le Cq correspond au nombre de cycles requis pour que la fluorescence émise soit statistiquement et significativement plus élevée que le bruit de fond.

La quantification relative c'est fait par la méthode $\Delta\Delta Cq$ (Modèle de Livak). D'abord, il y a eu normalisation par rapport au gène de référence ($Cq \text{ gène cible} - Cq \text{ gène référence} = \Delta Cq$) et ensuite, par rapport à l'échantillon non traité (calibrateur) ($\Delta Cq \text{ échantillon traité} - \Delta Cq \text{ Calibrateur} = \Delta\Delta Cq$). Finalement on détermine la variation du nombre de copies du gène cible ($2^{-\Delta\Delta Cq}$).

4.5.1 Caractérisation de la pureté et de l'intégrité de l'ARN total

Préalablement au qPCR, l'ARN total a été extrait et sa pureté a été évaluée avec le Bioanalyzer qui attribue une valeur d'intégrité pour l'ARN : RIN ("RNA Integrity Number"). Sachant que l'ARN est une molécule thermodynamiquement stable, elle est cependant rapidement dégradée en présence de RNase. Une dégradation de l'ARN risque de compromettre les résultats des expériences ultérieures de qPCR. Le RIN est ainsi un outil important qui détermine l'intégrité de l'ARN total extrait et permet d'assurer des résultats fiables de qPCR. Brièvement, l'intégrité des échantillons d'ARN est déterminée par leur profil électrophorétique. Le RIN peut prendre des valeurs entre 1 et 10, 1 étant un échantillon d'ARN complètement dégradé, et 10 étant la valeur maximale présentant un échantillon ayant une intégrité maximale (sans aucune dégradation). Les échantillons testés présentent un RIN moyen de 9.9 (**Tableau 4.3**), preuve de haute intégrité.

Tableau 4.3 RIN moyen de l'ARN total extrait des cellules MCF-7 et MCF-7 MDR non-transfectées, transfectées avec du chitosane (92-10), du chitosane (92-10-5)-MDR1siARN_1 et DharmaFECT-MDR1siARN_1. Les RIN ont été mesurés avec l'instrument "Agilent Bioanalyzer 2100"

Condition	RIN MOYEN
MCF-7 MDR Non-transfectées	9.95
MCF-7 Non-transfectées	9.75
MCF-7 MDR transfectées avec chitosane	9.95
MCF-7 transfectées avec chitosane	9.8
MCF-7 MDR transfectées avec chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1	9.85
MCF-7 transfectées avec chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1	10
MCF-7 MDR transfectées DharmaFECT/MDR1-siARN_1	10
MCF-7 transfectées DharmaFECT/MDR1-siARN_1	10

4.5.2 Étude de la stabilité de 8 gènes de référence

Afin d'évaluer l'efficacité du silençage du gène MDR1 suite au traitement des cellules MCF-7 MDR avec les nanoparticules, nous avons effectué une quantification relative. Cette quantification nécessite un gène de référence. Le gène de référence est un gène dont l'expression ne varie pas en fonction du traitement appliqué aux cellules. Rappelons que dans ce projet, le traitement consistait à transfecter des cellules avec des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN et de quantifier l'expression du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR. Grâce à sa stabilité, le gène de référence permet de mesurer la variation de l'expression du gène MDR1 ciblé par les siARN.

Il était donc important de tester d'abord la stabilité de différents gènes puis de choisir le meilleur candidat comme gène de référence pour effectuer la normalisation avec la méthode de quantification relative (RQ) ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) où le modèle de rendement corrigé

$$RQ = \frac{E_{\text{gène cible}}^{\Delta Cq(\text{échantillon control})}}{E_{\text{gène de référence}}^{\Delta Cq(\text{échantillon control})}}, \text{ où } E = \text{efficacité de la réaction PCR}.$$

Quatre conditions ont été réalisées dans cette expérience : des cellules MCF-7 MDR non-transfectées, des cellules MCF-7 MDR transfectées avec du chitosane seul, du chitosane (92-10-5)/MDR1siARN_2M ou des lipoplexes DharmaFECT-MDR1siARN_2M. L'ARN total a été par la suite extrait, purifié, quantifié, analysé par bioanalyzer et rétrotranscrit en ADNc. Les cellules non transfectées ont été aussi utilisées comme calibrateur pour normaliser les résultats par la méthode $\Delta\Delta Cq$. Le DharmaFECT a servi de contrôle pour évaluer son effet sur la stabilité du gène de référence. Après la rétrotranscription, une qPCR a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques aux gènes de référence (paires amorces + sonde spécifique). Une analyse en paire, des gènes de référence a été effectuée à l'aide du logiciel ExpressionSuite. Le manuel du logiciel et de la procédure d'exploitation standard associée ont été utilisés pour effectuer, étape par étape, l'analyse et l'exportation des données afin de choisir le meilleur candidat comme gène de référence.

Le but de cette étude a été d'identifier et de sélectionner le gène de référence le plus stable à utiliser comme facteur de normalisation pour l'évaluation du silençage du gène MDR1 par qPCR. Ainsi, huit gènes de référence ont été testés (**Tableau 4.4**), et ExpressionSuite a attribué un score pour chacun. Le logiciel donne le score en utilisant la méthode de Cq comparative ($\Delta\Delta Cq = Cq_{(\text{échantillon traité})} - Cq_{(\text{calibrateur})}$), où le calibrateur est l'échantillon non-traité. Le meilleur contrôle aura la $\Delta\Delta Cq$ la plus proche de zéro. Ceci signifie qu'il n'y a aucune variation dans l'expression du gène entre les différentes conditions testées. Le gène de référence ayant le plus petit score a été identifié comme celui le plus stable. Parmi les 8 gènes testés, le gène POLR2A a été choisi comme étant le plus stable avec un score de 0.463 (**Tableau 4.4**).

Tableau 4.4 Score des gènes de référence obtenu avec le logiciel ExpressionSuite

Gène de référence	Score
ACTB	0.909
ELF-1 α	0.746
GAPDH	0.622
PBGD	0.561
PUM1	0.500
POLR2A	0.463
TBP	0.487
TFRC	0.598

Les valeurs Cq ont été analysées par le logiciel ExpressionSuite pour attribuer un "Score" à chaque gène de référence testé

4.5.1 Quantification relative du gène MDR1 codant pour la protéine P-gp par q-PCR

Les cellules MCF-7 MDR, résistantes aux drogues, ont été transfectées avec du chitosane 92-10 libre, des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M, du DharmaFECT/MDR1-siARN_1, DharmaFECT/MDR1-siARN_1M, DharmaFECT/MDR1-siARN_2 et DharmaFECT/MDR1-siARN_2M. L'ARN total a été extrait des cellules puis rétrotranscrit en ADNc. Ensuite, l'ADNc a été utilisé pour quantifier de façon relative le gène MDR1 par qPCR. Les cellules non transfectées ont été utilisées comme calibrateur pour normaliser les résultats du qPCR par la méthode $\Delta\Delta Cq$. Rappelons que le gène POLR2A a été utilisé comme contrôle endogène (gène de référence), car son niveau d'expression varie peu ou pas au sein des cellules MCF-7 MDR transfectées ou non.

Les résultats obtenus, présentés dans la **Figure 4.4**, montrent que les nanoparticules à base de chitosane modifient l'expression du gène MDR1, dans les cellules MCF-7 MDR, en réduisant drastiquement l'expression à moins de 29%. Ce résultat a été obtenu avec les nanoparticules chitosanes/MDR1-siARN_2M et correspond à un silençage du gène MDR1 supérieur à 71%. Les résultats montrent que, dans les cellules transfectées avec les nanoparticules à base de chitosane, l'utilisation des duplexes avec des bouts dépassants d'ARN en 3' tendent à augmenter le taux de silençage du gène MDR1 par rapport à l'utilisation des duplexes avec les bouts dépassants d'ADN en 3'. Ainsi, on observe un silençage de 53 vs 65% et 44 vs 71% respectivement pour les nanoparticules chitosanes (92-10-5)/MDR1-siARN_1 vs chitosanes/MDR1-siARN_1M et chitosanes/MDR1-siARN_2 vs chitosanes/MDR1-siARN_2M. De la même façon, dans les cellules transfectées avec le lipoplexe DharmaFECT, l'utilisation des duplexes avec des bouts dépassants d'ARN en 3' augmentent considérablement le silençage du gène MDR1 par rapport à l'utilisation des duplexes avec des bouts dépassants d'ADN en 3'. Ainsi on observe un silençage de 50 vs 94% et 53 vs 92% respectivement pour les nanoparticules DharmaFECT/MDR1-siARN_1 vs DharmaFECT/MDR1-siARN_1M et DharmaFECT/MDR1-siARN_2 vs DharmaFECT/MDR1-siARN_2M. On remarque aussi que les cellules transfectées avec les duplexes siARN_1 ou siARN_2 (bouts dépassants d'ADN en 3'), montrent un silençage semblable peu importe le système de livraison utilisé (chitosane ou DharmaFECT). Alors que l'utilisation des duplexes siARN_1M ou siARN_2M (bouts dépassants d'ARN en 3') mène à un plus grand silençage du gène MDR1 dans les cellules transfectées avec le DharmaFECT

comparativement à celles transfectées avec le chitosane. De plus, tel qu'attendu, les cellules MCF-7 qui sont sensibles aux drogues expriment faiblement le gène MDR1.

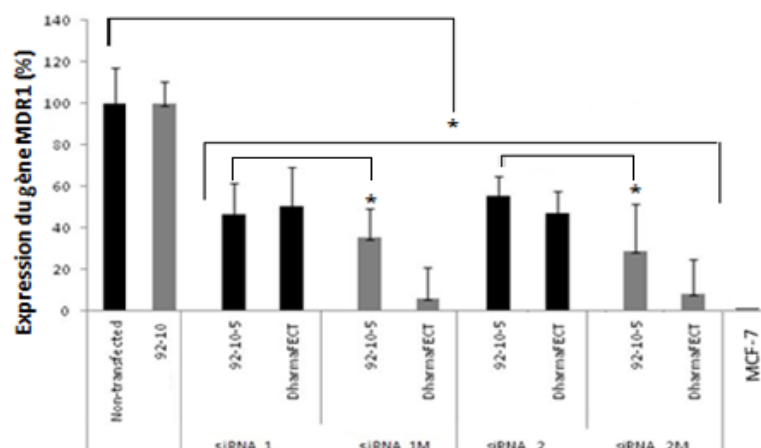


Figure 4.4 Analyse, par qPCR, de la réduction de l'expression du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR. Les cellules MCF-7 MDR ont été transfectées avec le chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, le chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2, le chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M et le chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M. L'efficacité du silençage a été évaluée en mesurant l'expression du gène MDR1 (%). Ce pourcentage a été calculé en comparant les cellules MCF-7 MDR transfectées et non transfectées en utilisant la méthode $\Delta\Delta C_q$. Le gène POLR2A a été utilisé comme contrôle endogène. Les cellules MCF-7 MDR non transfectées ont une expression du gène MDR1 fixé à 100%. L'expression du gène MDR1 a été aussi analysée dans les cellules MCF-7 non transfectées afin d'évaluer le niveau d'expression du gène MDR1 dans des cellules sensibles aux drogues (n=3, *p<0,05)

4.6 Resensibilisation à la Doxorubicine des cellules MCF7-MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane-siARN

On a démontré qu'il est possible de réduire le niveau d'expression du gène MDR1 responsable de la résistance aux chimiodrogues, dans les cellules MCF-7 MDR suite à leur transfection avec des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. La diminution de l'expression de la P-gp devrait ainsi resensibiliser les cellules MCF-7 MDR aux chimiodrogues

telles que la doxorubicine. Théoriquement, plus l'expression de la P-gp est réduite dans les cellules, plus ces dernières seront sensibles à la doxorubicine et plus leur taux de mortalité sera important lors d'une incubation en présence de doxorubicine. Le test bleu alamar, qui utilise la résazurine comme réactif, a permis de mesurer le taux de viabilité des cellules MCF-7 MDR transfectées avec des nanoparticules puis traité avec la doxorubicine.

4.6.1 Détermination du nombre de cellules à ensemercer et le temps d'incubation avec Alamar Bleu

Le bleu alamar est un indicateur sensible de l'état d'oxydoréducteur du milieu intracellulaire. Cependant, différentes lignées cellulaires répondent différemment au bleu alamar selon le temps d'incubation et le nombre de cellules ensemençées. De plus, le produit généré lors du test et mesuré par colorimétrie peut rapidement saturer si le nombre de cellules est trop élevé ou si le temps d'incubation avec le réactif est trop long. Ainsi, des tests ont été nécessaires afin de déterminer le nombre de cellules et le temps d'incubation idéal pour chaque lignée cellulaire utilisée. Les tests sur les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR ont permis de déterminer que le temps d'incubation avec le bleu alamar doit être entre 3 et 5 heures (**Figure 4.5** et **Figure 4.6**), et le nombre de cellules ensemençées doit être de 10 000 à 50 000 cellules/puits (**Figure 4.7** et **Figure 4.8**). Ainsi pour toutes les expériences de cytotoxicité ultérieure, un nombre de 10 000 cellules/puits a été ensemençé et le temps d'incubation avec le bleu alamar a été fixé à 4 heures (**Tableau 4.5**). Ces choix ont été effectués en déterminant les points sur les courbes ayant le plus grand coefficient de linéarité.

Il est à souligner qu'au jour des tests de cytotoxicité avec l'alarmar bleu, un comptage cellulaire à l'hémocytomètre a été effectué parallèlement à l'aide d'une coloration au bleu de trypan. Ce comptage cellulaire permet d'assurer que la quantité de cellules vivantes dans les puits s'inscrit dans la fourchette acceptable (soit entre 10 000 à 50 000 cellules/puits) pré-déterminée pour une évaluation fiable de la cytotoxicité par le test du bleu alamar.

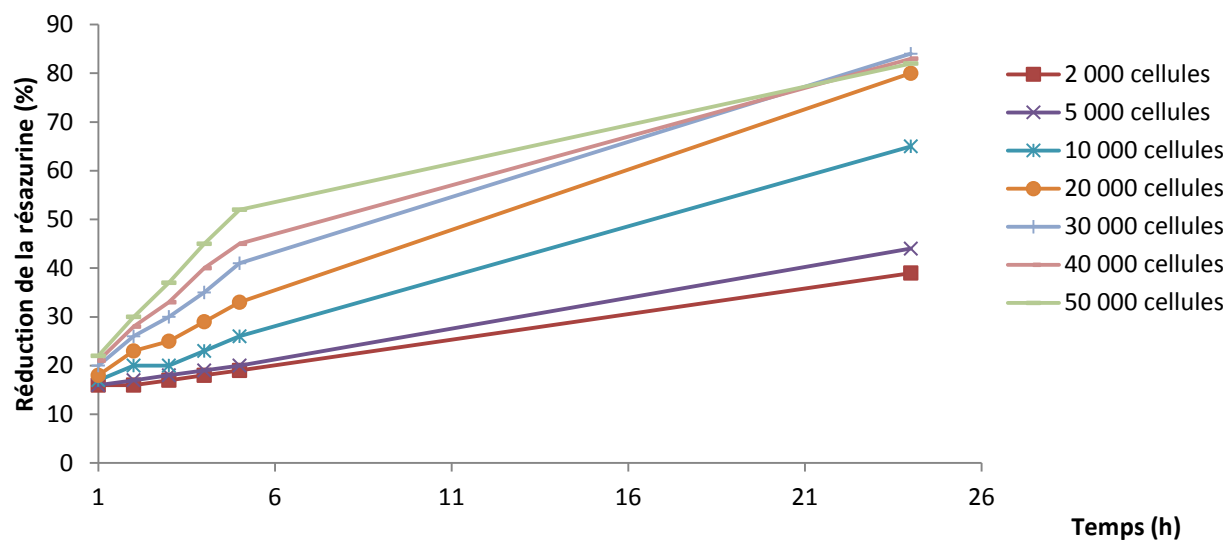


Figure 4.5 Réduction la résazurine en fonction de la durée (heures) de l'incubation du bleu alamar avec différentes quantités/puits de cellules MCF-7ensemencées dans une plaque de 96 puits.

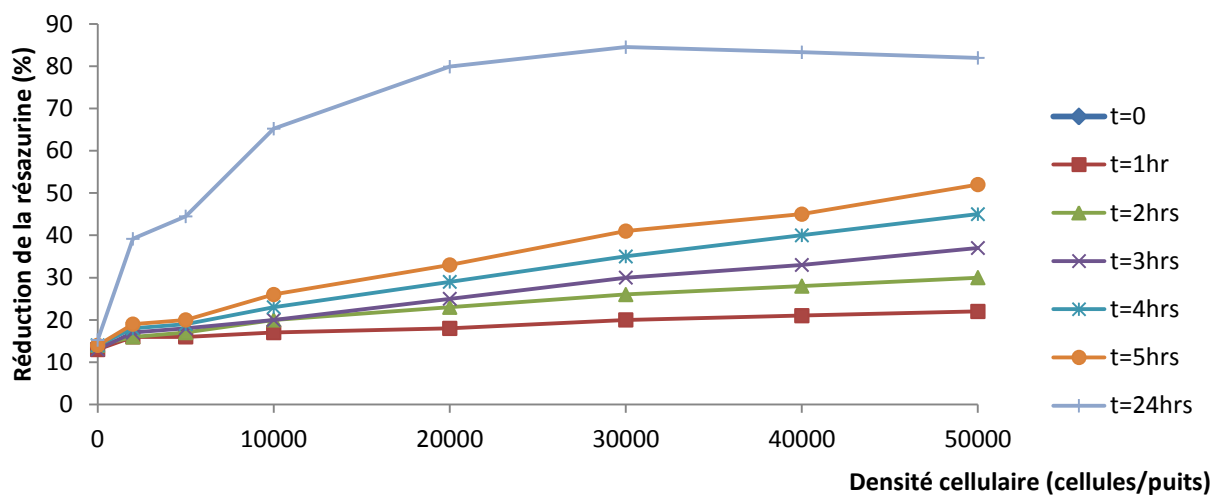


Figure 4.6 Réduction la résazurine en fonction des différentes quantités/puits de cellules MCF-7ensemencées dans une plaque de 96 puits pour différents temps d'incubation avec le bleu alamar.

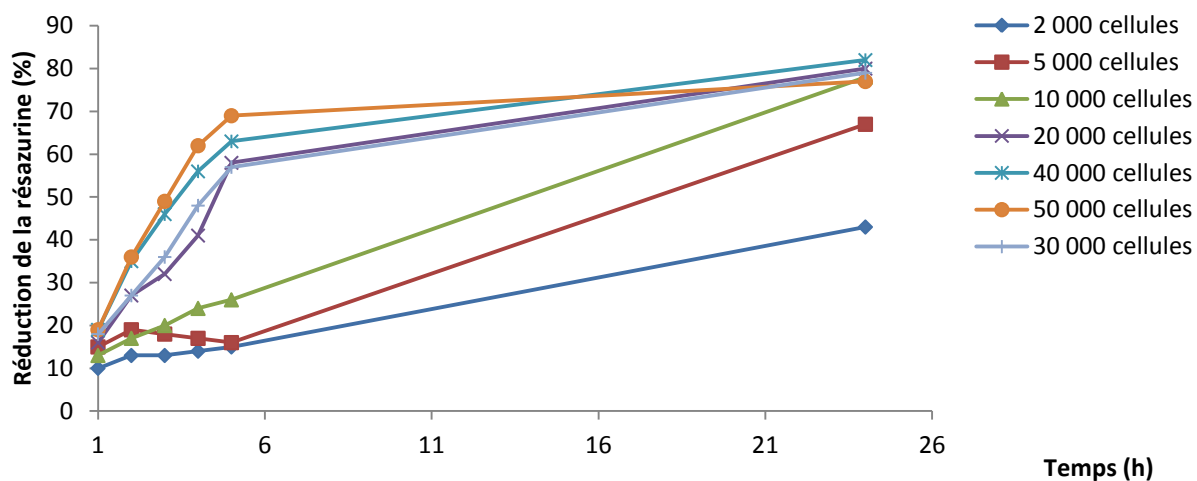


Figure 4.7 Réduction la résazurine en fonction de la durée (heures) de l'incubation du bleu alamar avec différentes quantités/puits de cellules MCF-7-MDR ensemencées dans une plaque de 96 puits

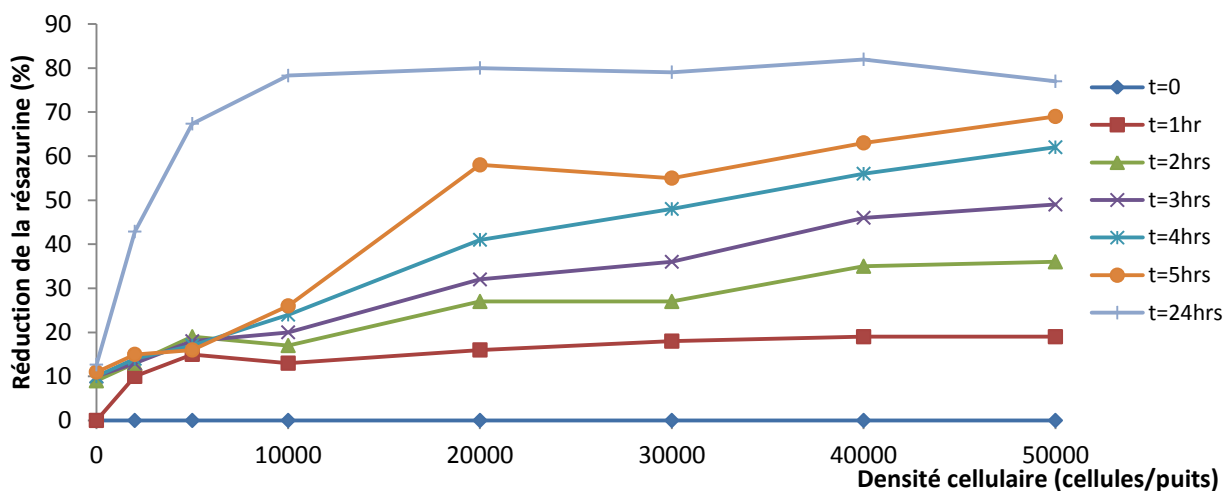


Figure 4.8 Réduction la résazurine en fonction des différentes quantités/puits de cellules MCF-7 MDR ensemencées dans une plaque de 96 puits pour différents temps d'incubation avec le bleu alamar.

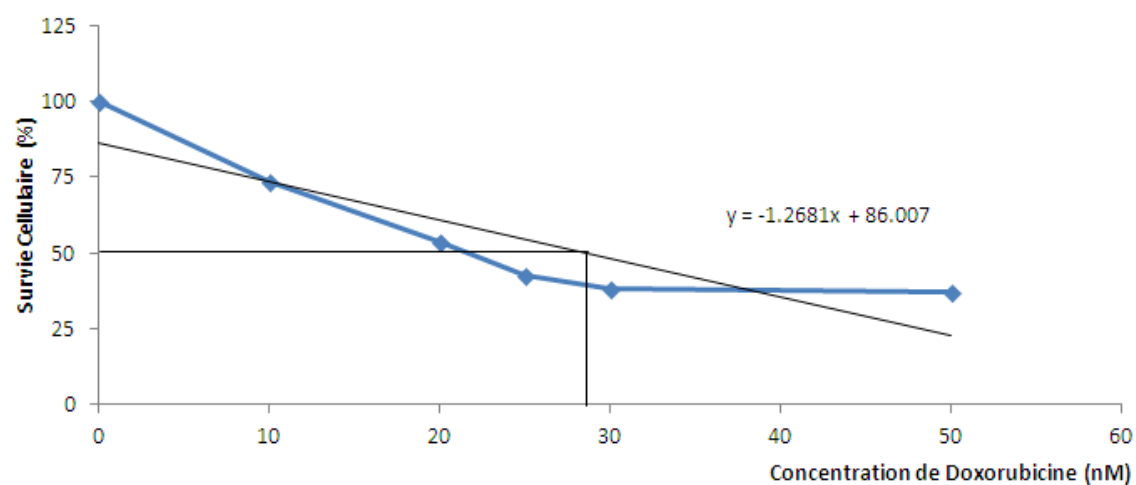
Tableau 4.5 Nombre de cellules MCF-7 et MCF-7 MDR à ensemercer dans un plateau de 96 puits et le temps d'incubation requis avec le bleu alamar pour mesurer la cytotoxicité.

	MCF-7	MCF-7 MDR
Densité cellulaire (cellules/puit)	10 000	10 000
Temps d'incubation avec le bleu alamar	4	4

4.6.1.1 Identification de IC50 de Doxorubicine

Afin de déterminer la concentration de doxorubicine à utiliser dans le test de resensibilisation des cellules MCF-7 MDR, les cellules ont été incubées pendant 48 heures avec la doxorubicine à différentes concentrations (0, 0.008, 0.5, 1, 10, 20, 25, 30 et 50 nM pour les cellules MCF-7 et 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8.6 μ M pour les cellules MCF-7 MDR). Les concentrations ont été choisies en fonction de la littérature.[177, 351, 352] Les **Figure 4.9 A et B** montrent respectivement le pourcentage de survie des cellules MCF-7 et MCF-7 MDR (mesurée par test du bleu alamar) en fonction de la concentration de doxorubicine. Ces résultats ont permis de déterminer la IC50 de la doxorubicine pour les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR (**Tableau 4.6**). L'IC50 de la doxorubicine (la concentration causant 50% de mortalité) est de 28.4 nM et de 6.7 μ M pour les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR respectivement (**Tableau 4.6**). Les cellules MCF-7 MDR, caractérisées par leur résistance à la doxorubicine, montre un IC50 qui est 236 fois plus élevé comparativement à celui des cellules MCF-7, sensibles à la doxorubicine.

(A)



(B)

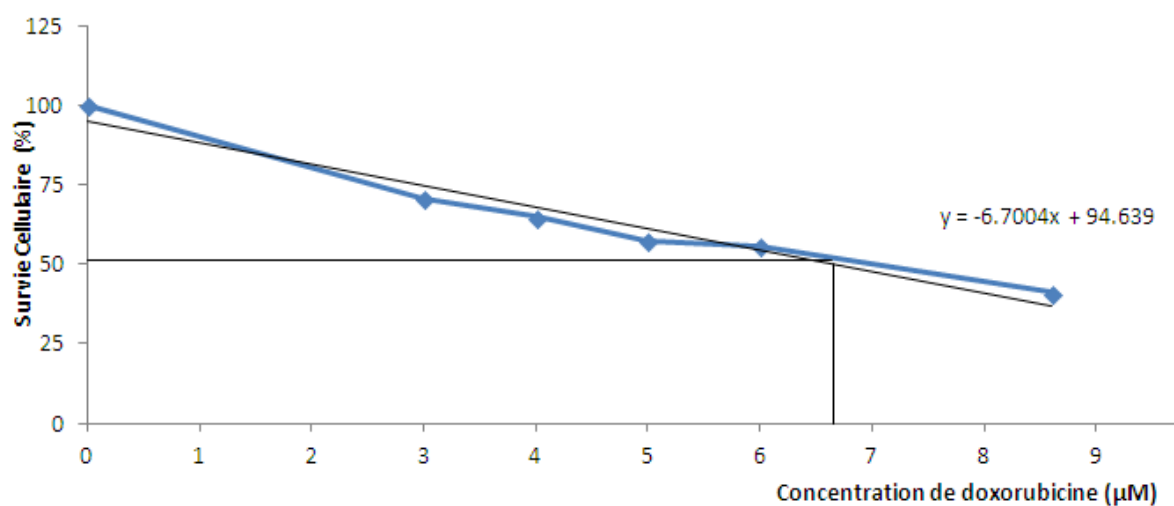


Figure 4.9 Sensibilité des cellules MCF-7 (A) et MCF-7 MDR (B) à la doxorubicine. Pourcentage (%) de la survie cellulaire, mesurée par un test de bleu alamar, en fonction de la concentration de doxorubicine (nM ou µM)

Tableau 4.6 IC50 de doxorubicine pour MCF-7 et MCF-7 MDR

	MCF-7	MCF-7 MDR
IC50	28.4 nM	6.7 μ M

4.6.1.2 Test de toxicité des nanoparticules

Avant de procéder à l'évaluation de l'efficacité du silençage du gène MDR1 via un test de re-sensibilisation, il était important de tester la toxicité du chitosane 92-10 libre, des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, Chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, Chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2, Chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M, DharmaFECT/MDR1-siARN_1, DharmaFECT/MDR1-siARN_1M, DharmaFECT/MDR1-siARN_2 et DharmaFECT/MDR1-siARN_2M. Le test de la toxicité des nanoparticules permet de s'assurer que la mortalité des cellules MCF-7 MDR transfectées est bien due au silençage du gène MDR1 qui resensibilise les cellules à la doxorubicine et non due à une toxicité des nanoparticules. Des cellules non-traitées et traitées avec DharmaFECT-siARN ont été utilisées comme contrôle négatif et positif respectivement. Les résultats obtenus avec le bleu alamar montrent une viabilité totale pour les cellules non-traitées, ainsi que pour celles traitées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN (**Figure 4.10**). Tel qu'attendu on observe une plus forte mortalité cellulaire suite à la transfection avec les nanoparticules formées de DharmaFECT (**Figure 4.10**). Les liposomes sont, en effet, reconnus pour leur forte toxicité.[353, 354]

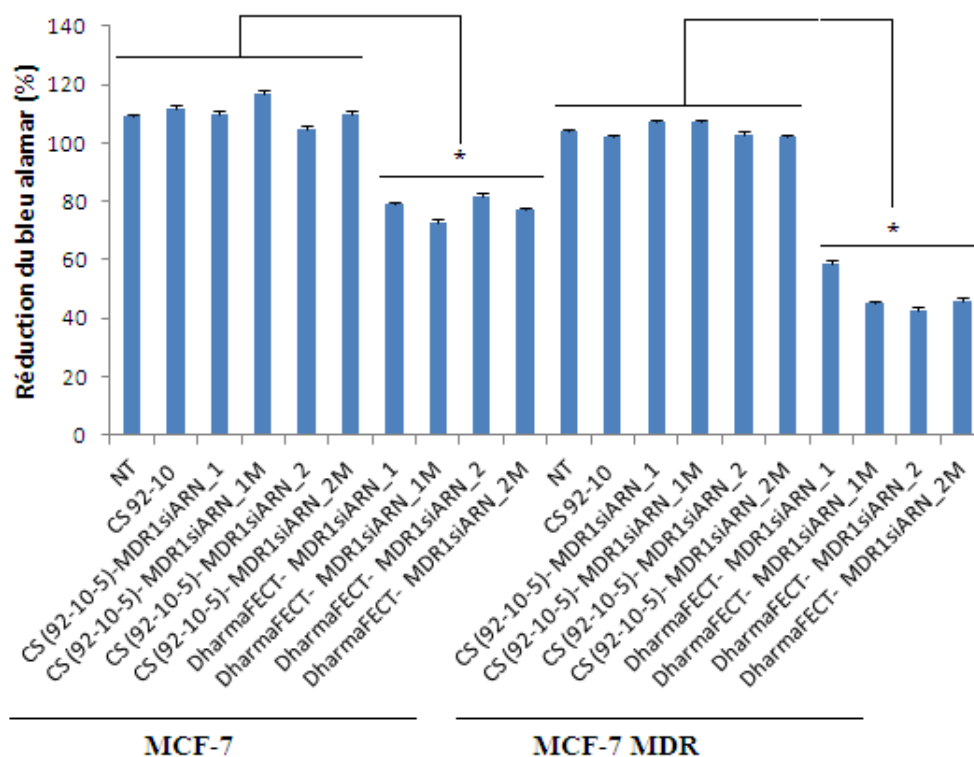


Figure 4.10 Effet cytotoxique des nanoparticules sur les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR. (n=3, *p<0.05).

4.6.1.3 Test de resensibilisation à la doxorubicine des cellules transfectées.

Une fois qu'il a été prouvé que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN ne sont pas toxiques pour les cellules, il a été possible d'étudier la resensibilisation à la doxorubicine des cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. Les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules ont été ensuite traitées avec de la doxorubicine à 6.7 μ M (valeur de IC50 préalablement identifiée). La viabilité cellulaire a été mesurée 48 heures après l'ajout de la doxorubicine par une analyse colorimétrique bleu alamar. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 4.11**. La transfection des cellules MCF-7 MDR avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1 et chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2, a permis une mortalité ~50% des cellules par un traitement à la doxorubicine. La transfection des cellules MCF-7 MDR avec des nanoparticules à base de chitosane et des duplexes, ayant des extrémités 3' d'ARN au lieu d'ADN, tend à faire augmenter

la mortalité des cellules suite au traitement avec la doxorubicine. On observe une mortalité moyenne de 47% chez les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN comparé à une moyenne de 75% de mortalité obtenue avec DharmaFECT/MDR1siARN. Cependant, cette forte mortalité n'est pas totalement due à la resensibilisation obtenue par le silençage, mais en partie à la nature toxique du DharmaFECT.[353, 354] Il est important de noter que la mortalité observée (~50%) des cellules MCF-7 MDR non-transfectées et traitées avec la doxorubicine ont été normalisées à 100%. Ainsi les pourcentages de mortalités présentés dans la **Figure 4.11** sont relatifs aux cellules non-transfectées. Aucune différence significative dans la mortalité n'a été observée en changeant la nature des extrémités dépassantes en 3' des duplexes lors de la transfection des cellules avec les nanoparticules à base de chitosane ou de DharmaFECT. On n'obtient aucune survie pour les cellules MCF-7 non transfectées et traitées avec de la doxorubicine à 6.7 μM .

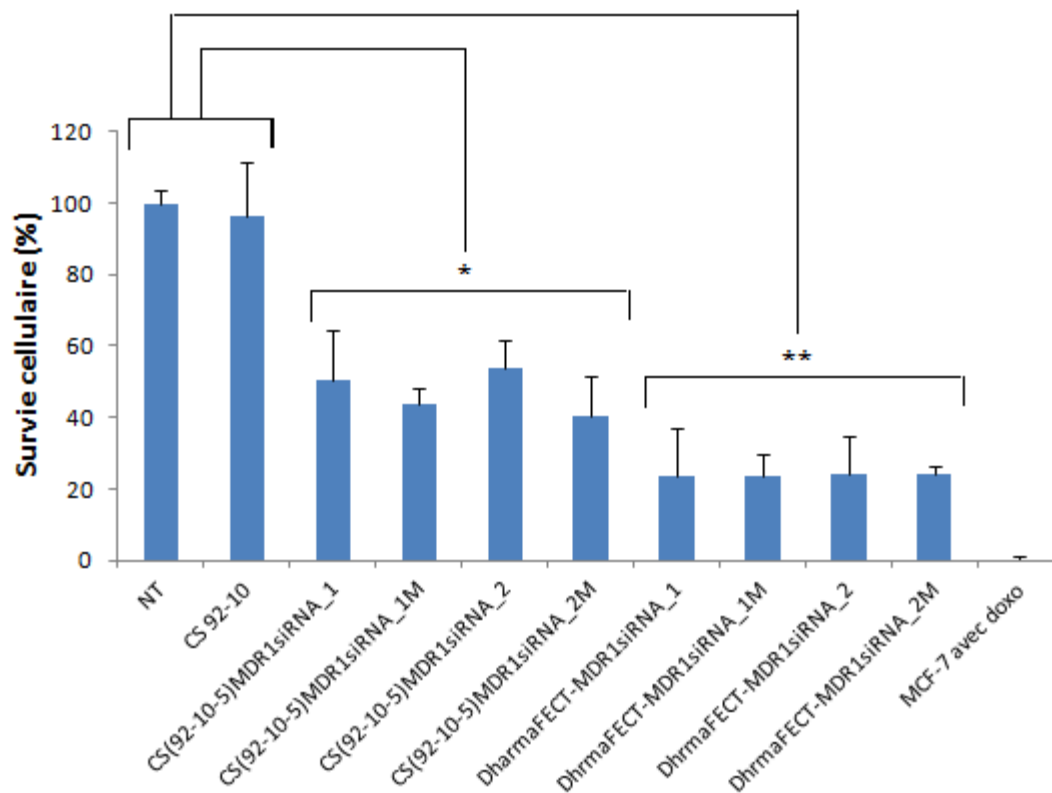


Figure 4.11 Resensibilisation des cellules MCF-7 MDR à la doxorubicine. Les cellules MCF-7 MDR préalablement transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN ou DharmafECT/MDR1-siARN ont été traitées à la doxorubicine (6.7 μ M) pendant 48 heures. La prolifération cellulaire a été mesurée par un test de bleu alamar en mesurant l'absorbance à 570 nm (avec 610 nm comme longueur d'onde de référence). (n=3, * $p < 0.05$). **Il est important de noter que la mortalité observée (50%) des cellules MCF-7 MDR non-transfectées et traitées avec la doxorubicine ont été normalisées à 100%.**

CHAPITRE 5 DISCUSSION

L'accumulation des mutations dans des endroits spécifiques du génome peut aboutir à une division non contrôlée d'une ou de plusieurs cellules. Cette division cellulaire anormale, si elle demeure non-contrôlée par le système de défense de l'organisme, sera la cause du développement d'une tumeur. L'irradiation par les rayons gamma, la chirurgie et la chimiothérapie sont les principaux traitements conventionnels du cancer.[355] La chimiothérapie occupe une place importante dans le traitement de plusieurs types de cancer. Cependant, le succès de la chimiothérapie est souvent limité par des mécanismes de résistance. De ce fait, l'usage des siARN fait parti des méthodes innovatrices utilisées pour contourner la chimiorésistance et améliorer l'efficacité de l'agent anticancéreux.[356, 357] Ces petits ARN double-brins sont capables de lier spécifiquement une séquence d'ARNm cible (dans notre cas ARNm du gène MDR1) et induire sa dégradation. Cette dégradation aboutit ainsi à un silençage post-transcriptionnel permettant donc l'inhibition de la traduction de la protéine P-gp, responsable de la chimiorésistance.

Les ARN d'interférence (ARNi) ont attiré beaucoup d'attention dans les dernières années grâce à leur potentiel de former une nouvelle classe de traitements thérapeutiques contre diverses maladies dont le cancer, l'infection virale et les troubles génétiques.[358-362] L'ARNi est clivé par la protéine Dicer en petits fragments nommés siARN. Le brin guide des siARN se lie au complexe RISC et à l'ARNm complémentaire, ce qui aboutira à la dégradation de l'ARNm d'intérêt (dans notre cas ARNm du gène MDR1) inhibant ainsi la traduction de la protéine cible (P-gp).[363] Cependant, plusieurs défis doivent être surmontés afin d'assurer une application efficace des siARN. Parmi les problèmes majeurs à contourner, on note une instabilité dans le milieu physiologique (dégradation par les RNase), une faible internalisation intracellulaire à cause de leur charge anionique, et une stabilité limitée dans le sang. Afin de surmonter ces obstacles, le recours à un système de livraison est essentiel. Ceci est nécessaire afin d'augmenter l'internalisation intracellulaire et la stabilité du siARN en présence de nucléases.[364]

Choisi comme un système de livraison dans ce présent travail, le chitosane est un polymère linéaire ((1-4)-2-amino-2-deoxy- β -d-glucane) obtenu à partir de l'acétylation partielle de la chitine.[365]. Le chitosane est caractérisé par une charge positive à cause de la protonation de ses groupements amines. Cette densité de charge positive favorise une interaction

électrostatique avec les siRNA chargés négativement permettant ainsi la formation des nanoparticules stables.[246, 366]

Le présent projet de recherche consiste à resensibiliser les cellules cancéreuses du sein MCF-7 MDR à la doxorubicine en utilisant les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. Les MDR1-siARN sont spécifiques au gène MDR1 qui code pour la protéine P-gp. La protéine P-gp est surexprimée chez les cellules MCF-7 MDR et fait partie des causes principales de la résistance de ces cellules aux chimiodrogues, dont la doxorubicine. Quatre séquences de siARN ont été testées : MDR1-siARN_1, MDR1-siARN_2, MDR1-siARN_1M et MDR1-siARN_2M. Chacune de ces séquences a été utilisée avec le chitosane (92-10) selon un ratio N:P de 5 pour former les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M et chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M. Les overhangs (bouts dépassants) des siARN_1 et siARN_2 sont formés d'ADN (dTdT) tandis que ceux des siARN_1M et siARN_2M sont formés d'ARN (rArG et rUrU respectivement). Les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siRNA ont tout d'abord été préparées et leurs propriétés physicochimiques ont été déterminées. L'internalisation des nanoparticules chitosane-siARN dans les cellules MCF-7 MDR a été analysée par imagerie confocale. Par la suite, le pouvoir des nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN à transfecter les cellules H1299 eGFP⁺ a été évalué. Ensuite, la présence de l'ARNm du gène MDR1 exempt de mutation a été vérifiée chez les cellules MCF-7 MDR. De plus, on a étudié l'efficacité de silençage du gène MDR1 en utilisant des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, et une attention particulière a été portée sur l'effet des overhangs sur cette réponse. Enfin, après avoir transfecté les cellules MCF-7 MDR avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, on les a traité avec doxorubicine, et la mortalité cellulaire a été mesurée.

5.1 Caractérisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN

Une transfection efficace se base sur le pouvoir du chitosane à jouer le rôle d'un système de livraison. Ceci implique une livraison sécuritaire du siARN à l'intérieur des cellules (MCF-7 et MCF-7 MDR). Une fois le siARN est libéré à l'intérieur de la cellule, il silençera le gène cible (MDR1 dans notre cas). Cependant, le plus grand défi est de surmonter les difficultés que parcourent les siARN à circuler dans le sang, passer à travers la membrane cellulaire, se libérer

des endosomes et des lysosomes afin d'aller se lier à la séquence cible d'ARNm. Ainsi, nombreux efforts ont été dédiés au développement de système de livraison qui soit non-toxiques, biocompatibles et biodégradables.[367] Le chitosane est un polysaccharide cationique largement utilisé comme système de livraison dans le domaine de la thérapie génique. [368-370]

Dans ce projet de recherche, le chitosane (92-10) a été utilisé comme système de livraison des MDR1-siARN. Ce choix est basé sur le fait que le chitosane est biocompatible, non-inflammatoire, non-toxique et biodégradable.

Les caractères physicochimiques sont des composants importants qui déterminent le pouvoir du chitosane à former des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN ayant la taille, charge et stabilité appropriées pour passer à travers la membrane cellulaire et libérer le siARN dans le cytoplasme. Une transfection efficace permettra de silencer le gène MDR1 codant pour la protéine P-gp, qui elle, est responsable de la résistance des cellules MCF-7 MDR aux chimiodrogues (Doxorubicine). Sachant que la membrane cellulaire est chargée négativement, il est nécessaire que les nanoparticules soient chargées positivement (un potentiel zêta positif approximatif de ~ 20 mV), et qu'elles aient un diamètre plus petit que 150 nm afin de pouvoir se lier puis traverser facilement la double membrane cellulaire.[347, 348] Les nanoparticules doivent aussi avoir un diamètre plus grand que 15 nm pour éviter l'élimination rénale lors d'une administration *in vivo* et une polydispersité plus petite que 0.3.[349, 350] Une polydispersité inférieure à 0.3 indique que les nanoparticules sont monodispersées, c'est-à-dire qu'elles ont des dimensions égales ou très voisines augmentant ainsi l'efficacité de transfection.[44] Dans le but de déterminer la grandeur et la charge de la surface des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN en solution, le potentiel zêta, la taille et la polydispersité (PdI) ont été mesurés en utilisant l'appareil Zetasizer Nano Zs par des techniques de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Les résultats de la DLS démontrent que les nanoparticules possèdent une taille entre 62 et 83 nm (**Tableau 4.1**) et sont en accord avec les résultats présentés par Myriam et al. (2012). Myriam et al. ont préparé des chitosane/siARN ayant une taille entre 68 et 129 nm.[44] Cette distribution de taille favorise l'internalisation cellulaire des nanoparticules et leur diffusion à travers l'endothélium vasculaire. Grâce à cette taille nanométrique, les nanoparticules seront capables aussi de franchir le système de phagocytaire mononucléé, ce qui assure une circulation sanguine prolongée [371, 372] en évitant la filtration rénale et les cellules de Kupfer (macrophages propres au foie).[373]

D'autre part, les résultats du potentiel zêta démontrent que les nanoparticules possèdent une charge positive (+20mv) conforme à ce qui a été publié dans la littérature où les auteurs reportent des valeurs positifs pour les nanoparticules à base de chitosane.[277, 294, 366, 374] La charge positive des nanoparticules chitosane-siRNA est due au DDA élevée (92%). Défini comme le pourcentage des groupements amines désacétylés, ce paramètre influence la densité de charge du chitosane suite à sa dissolution dans un milieu acide. En effet, une valeur de DDA élevée induit une augmentation de la charge positive de chitosane favorisant son interaction électrostatique avec les siRNA et la formation de nanoparticules stables.[279, 374-376] Les groupements amines chargés positivement permettent au chitosane de passer à travers la membrane cellulaire et d'être internalisé dans la cellule par endocytose.[377, 378] Enfin, la polydispersité (pdI) des nanoparticules est un indicateur sur leur uniformité lors de la préparation, c.-à-d. qu'elles ont toutes une forme et diamètre semblables. Les résultats obtenus, étant de 0.2, sont en accord avec la littérature et font preuve que les nanoparticules sont uniformes. Ceci signifie une efficacité d'adsorption maximale.[379] Nurkhasanah et al, en 2015, ont caractérisé des nanoparticules à base du chitosane et ont reporté des pdI proches de 0.3.[380, 381]

Les résultats obtenus par DLS (taille, potentiel zêta et PdI) montrent que les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN ont des tailles, des potentiels zêtas et des polydispersités recherchés pour permettre une transfection efficace *in vitro* et *in vivo*. Les nanoparticules formées sont 1) chargées positivement et devraient alors interagir avec la membrane cellulaire, 2) assez petites pour passer à travers la membrane et 3) ont toutes des diamètres semblables. Les résultats obtenus permettent de procéder avec la transfection des cellules MCF-7 MDR afin de silencer le gène MDR1 codant pour la protéine P-gp. [347-350] [347-350]

Pour conclure, la caractérisation physicochimique des nanoparticules préparées, soit les chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2 et chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M, prouve qu'elles sont capables de transfecter les cellules MCF-7 MDR et silencer le gène MDR1. Ces résultats nous ont permis de procéder à la quantification du gène MDR1 suite à la transfection des cellules MCF-7 MDR avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN.

5.2 Vérification du pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN

Avant de procéder à la quantification de l'expression du gène MDR1, il était nécessaire de tester l'efficacité de transfection avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN ainsi que l'efficacité de silençage du gène visé. En effet, le premier objectif est une preuve du pouvoir que le chitosane possède comme système de livraison, tandis que le deuxième objectif montre que le siARN est capable de se libérer du chitosane pour aller se lier à l'ARN messager en question afin de silençer le gène cible. Ainsi, afin de répondre à ces deux objectifs, on a réalisé une étude préliminaire en transfectant des cellules H1299 eGFP⁺ avec des nanoparticules à base de chitosane 92-10. Les cellules H1299 eGFP⁺ expriment de façon stable la protéine fluorescente eGFP. Suite à la transfection, la fluorescence émise par la protéine eGFP a été évaluée par cytométrie en flux (FACS). La variation de la fluorescence a permis d'évaluer le pourcentage de silençage du gène eGFP dans les cellules transfectées avec les nanoparticules. En effet, la diminution de la fluorescence est corrélée avec l'inhibition de l'expression de la protéine fluorescente eGFP. Cette inhibition est le résultat de la capacité du système de livraison à franchir la bicouche lipidique et libérer les siARN dans le cytosol. Un silençage important est donc associé à une transfection efficace. Cette expérience consiste à évaluer le pouvoir de transfection des nanoparticules chitosane-siARN préparées avec la formulation: 92-10-5. Les résultats de la cytométrie en flux (40% de silençage eGFP) démontrent tout d'abord que les nanoparticules préparées avec la formulation 92-10-5 sont capables de franchir la membrane cytoplasmique et de libérer les siARN dans le cytoplasme cellulaire. Ceci est directement lié au pouvoir du chitosane (92-10-5) à livrer les siARN à l'intérieur de la cellule. Une fois les siARN sont dans le cytosol, ils seront incorporés par RISC aboutissant ainsi à la dégradation de l'ARNm du gène cible. Les valeurs du silençage obtenues suite à la transfection des cellules H1299 eGFP⁺ par les nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN, supportent des études antérieures effectuées dans notre laboratoire.[44] De plus, la spécificité du siARN à silençer un gène en particulier a été confirmée par la transfection des cellules H1299 eGFP⁺ avec du chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN leurre et par l'obtention d'aucun silençage du gène eGFP. Ainsi, les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN peuvent être utilisées pour la transfection efficace des cellules MCF-7 MDR afin de réduire l'expression du gène MDR1 codant pour la protéine P-gp, protéine responsable de la chimiorésistance.

Nos résultats sont en corrélation avec les travaux de Howard et al. en 2006 (obtention de 77% de réduction dans l'expression de eGFP chez les cellules cancéreuses du poumon transfectées avec chitosane/eGFPsiARN).[319] La différence entre le silençage de eGFP obtenu dans notre expérience et celle obtenue avec Howard et al. peut être expliquée par la différence au niveau du rapport N:P utilisé. En effet, Howard et al. ont utilisé un rapport de 6 (5 dans notre cas), signifiant qu'il y a 6 fois plus de groupements amines par rapport aux groupements phosphate.[319] Une étude réalisée par Katas et al. (2007) a montré une diminution du potentiel zêta (de 60 à 40 mV) avec la diminution du ratio N:P (6 à 4), ce qui se traduit par une diminution de l'efficacité de transfection.[282]

Pour conclure, la transfection des cellules H1299 eGFP⁺ avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN confirme la capacité du chitosane à franchir la membrane cytoplasmique et échapper la barrière endosomale. Une fois dans le cytoplasme, les siARN ont été incorporés par RISC induisant ainsi la dégradation de l'ARNm cible d'où la diminution de la fluorescence observée dans les résultats de silençage. Ces données ont permis la poursuite du projet de recherche en utilisant comme un modèle cellulaire les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR.

5.3 Microscopie confocale

Les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, ainsi que le silençage obtenu par la transfection des cellules H1299 eGFP⁺ avec chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN prouvent que ces nanoparticules sont capables de traverser la membrane cellulaire. Cependant, il était important de visualiser le comportement de la nanoparticule chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, ainsi que le "sort" du chitosane et du siARN, une fois que la nanoparticule est mise en contact avec le milieu cellulaire. La microscopie confocale a permis d'analyser les cellules MCF-7 MDR et le comportement des nanoparticules chitosane (92-10-5)/siGLOTM. Trois conclusions ont été tirées de cette expérience. Premièrement, les images obtenues confirment que les nanoparticules sont capables de franchir la membrane cellulaire. Deuxièmement, les nanoparticules sont capables de se libérer des endolysosomes. Et troisièmement, le siARN est libéré dans le cytosol. En effet, le pouvoir des nanoparticules à franchir la membrane cellulaire est une confirmation des résultats potentiel zêta et la taille mesurés des chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. Par la suite, l'échappement des nanoparticules des endolysosomes est expliqué par le ratio N:P (donc l'excès du chitosane) et par l'effet d'éponge

à protons. En effet, Thibault et al. (2011) expliquent que l'excès du chitosane libre dans la solution est essentiel pour une transfection efficace. Ceci permet aux nanoparticules chitosane (92-10-5)/siARN de s'échapper des endolysosomes.[382] Vu qu'un ratio N:P de 5 a été utilisé dans ce projet, le résultat qu'on a obtenu est en accord avec l'étude menée par Thibault et al. (2011). Selon l'effet d'éponge à protons, une diminution du pH a lieu lors de la maturation des endosomes, et aboutit à une augmentation de la charge du chitosane. L'augmentation de la charge positive à l'intérieur des endosomes va attirer les ions chlorures, ce qui augmentera la pression osmotique et éclatera les endosomes. [297, 298] Enfin, la libération du MDR1-siARN dans le cytosol est soutenue par le principe de déstabilisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN causée par le pH de la cellule.[383]

La présence des siARN dans le cytosol des cellules MCF-7 MDR suite à leur transfection avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/siGLO™ a prouvé l'efficacité de transfection. Ce résultat est en accord avec l'expérience préliminaire réalisée sur les cellules H1299 eGFP⁺. Afin d'étudier l'effet du MDR1-siARN sur l'expression du gène MDR1 codant pour la protéine P-gp, une RT-qPCR a été réalisée. Cependant, il était nécessaire de vérifier la présence de l'ARNm du gène MDR1 exempt de mutations dans les cellules MCF-7 MDR.

5.4 Confirmation de la présence de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR

Les cellules MCF-7 MDR sont caractérisées par une surexpression de la P-gp, protéine cible à inhiber dans le cadre de ce présent travail. L'inhibition de cette protéine se fait par le silençage du gène MDR1 qui la code. Avant de procéder à la transfection des cellules MCF-7 MDR avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, il était primordial de s'assurer de la présence de l'ARNm du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR et que la séquence ciblée par nos MDR1-siARN est exempt de mutation(s).

Des amorces spécifiques ont été utilisées afin de confirmer, par PCR, la présence du gène MDR1. Les amplicons obtenus ont la taille attendue de 1010 pb et correspondent au fragment du gène MDR1. Les amplicons ont été par la suite séquencés par la technique de Sanger et les séquences obtenues ont été analysées par le logiciel BioEdit. Ce dernier permet d'effectuer une comparaison avec les séquences obtenues et la séquence référence du gène MDR1 (NCBI : NM_000927). Les résultats obtenus permettent de confirmer l'intégrité de la séquence et donc

l'appariement possible des siARN à l'ARNm du gène MDR1. Une fois qu'on a confirmé que l'ARNm du gène MDR1 était présent dans les cellules MCF-7 MDR et ne contenait aucune mutation, une qPCR a été réalisée afin de quantifier l'expression du gène MDR1 dans les cellules transfectées ou non avec nos nanoparticules.

5.5 Design et détermination des meilleurs gènes de référence pour la quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour le gène MDR1

Le gène MDR1 et la protéine P-gp codée par le gène MDR1 sont surexprimés chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 MDR.[19, 137] Le but de notre projet de recherche était donc de silencer le gène MDR1 afin de réduire l'expression de la protéine P-gp, responsable de l'expulsion des chimiodrogues à l'extérieur de la cellule et donc de la résistance développée à la chimiothérapie. Une des façons permettant de silencer un gène est par l'emploi des siARN. Ainsi, on a transfecté les cellules MCF-7 MDR avec des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN (en utilisant quatre séquences de siARN différentes, soit le siARN_1, siARN_2, siARN_1M et siARN_2M) dont leurs caractéristiques physicochimiques ont été vérifiées à être dans les normes pour une transfection efficace.

Afin de quantifier l'expression d'un gène (MDR1 dans notre cas), une qPCR est nécessaire. La qPCR permet de mesurer la variation de l'expression du gène étudié en comparaison avec un gène de référence, caractérisé par une expression stable.[384] Cependant, l'expression du gène de référence peut être différente selon les tissus, et selon les circonstances. Ainsi, la stabilité du gène de référence est cruciale pour mesurer d'une façon fiable et précise le nombre de transcrits du gène étudié.[385] Ce n'est que très récemment que Lin-Lin Liu et al. (2015) ont identifié un gène de référence valide pour la normalisation de l'expression de gène par qPCR chez des cellules cancéreuses du sein (HCC1937, HCC1806, HCC1500, BT474, T47D, MDA-MB-231, SKBR3, MCF-7 et MCF-10A).[386] Ils ont identifié la combinaison ACTB-GAPDH comme la meilleure pour les cellules cancéreuses du sein de type basal (HCC1806, HCC1937, MDA-MB-231, et SUM149PT) et HSPCB-ACTB comme celle à utiliser pour les cellules cancéreuses du sein ER⁺ (HCC1500, MCF-7, T47D et BT474).[386]

Dans le présent projet de recherche, les valeurs Cq des différents gènes de référence (GAPDH, ACTB, POLR2A, PUM1, TFRC, TBP, ELF1a et PBGD) ont été calculées à partir de celles traitées vs. non-traitées et une comparaison par paire, en utilisant le logiciel statistique

ExpressionSuite a été réalisée. Il est à noter que l'intégrité des ARN extraits des cellules est cruciale pour obtenir des résultats significatifs de l'expression du gène par qRT-PCR. L'intégrité de l'ARN est mesurée selon la valeur de son RIN. Le RIN peut prendre une valeur entre 1 et 10, où 10 signifie que l'ARN a une intégrité parfaite. Les RIN obtenus lors de cette expérience avaient une valeur moyenne de 9.9. Le(s) gène(s) de référence avec le plus bas M score a/ont été considéré(s) comme le(s) plus stable(s) sous les conditions expérimentales testées. Ainsi, les résultats de cette expérience apportent de l'information sur trois points importants. Premièrement, en comparant le niveau d'expression des gènes de référence choisis par condition, et entre les conditions elles-mêmes, le gène le plus stable est POLR2A. Ce résultat est en désaccord avec Lin-Lin Liu et al. (2015) et peut être expliqué par le fait que : 1) POLR2A ne faisait pas partie de leur choix de gènes, 2) le choix des gènes est totalement différent (sauf pour GAPDH, ACTB et PUM1) et 3) les cellules MCF-7 MDR ne faisaient pas parti de leur choix de cellules. Deuxièmement, la stabilité du gène de référence POLR2A n'est pas affectée par le chitosane 48 heures après transfection. Enfin, la stabilité du gène de référence POLR2A n'est pas affectée lorsqu'on compare les deux conditions : cellules transfectées avec du chitosane vs. les cellules traitées avec les lipides (DharmaFECT).

Il est intéressant de mentionner que notre résultat est en accord avec les travaux de Saviozzi et al. (2006) qui ont mené une étude pour sélectionner le gène de référence le plus stable pour la normalisation de l'expression de gène chez les cellules cancéreuses du poumon.[387] Ils ont conclu que POLR2A fait partie des gènes de référence pouvant être utilisés en qPCR. D'autre part, GAPDH et PBGD sont des gènes de référence utilisés fréquemment dans les études de silençage du gène MDR1 chez les cellules cancéreuses du sein.[388, 389] La différence au niveau des gènes de référence utilisés dans les différentes études est inquiétante vu que les conclusions obtenues peuvent être totalement différentes dépendamment du gène de référence choisi.

Ayant le score le plus faible (0.463) et donc une expression stable quel que soit la condition expérimentale testée, le gène POLR2A a donc été identifié comme le gène de référence le plus stable. Par conséquent, il a été utilisé comme contrôle endogène dans l'expérience de qPCR visant à identifier l'efficacité du silençage du gène MDR1 chez les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. Au meilleur de notre connaissance, on est le premier groupe à mener une étude sur la détermination de l'expression de

gène MDR1 chez les cellules cancéreuses du sein MCF-7 MDR en utilisant le gène POLR2A comme gène de référence.

5.6 Quantification relative du niveau d'expression de l'ARNm codant pour le gène MDR1 et l'effet des extrémités dépassantes (overhangs) des siARN sur l'efficacité du silençage

Les travaux de recherche dans notre laboratoire portant sur la formulation idéale du chitosane pour une efficacité de transfection cellulaire maximale ont permis de conclure que, *in vitro*, le chitosane ayant un DDA de 92, une Mn de 10 et complexé avec du siARN selon un ratio N:P de 5, possédait le grand pouvoir de livraison (Lavertu et al., 2006)[48]. De plus, Jean et al. (2012) et Alameh et al. (2012) avaient étudié l'effet du ratio N:P sur le silençage.[44, 375] Ils ont obtenu le meilleur silençage avec le ratio N:P de 5. Peu d'études ont été menées sur le silençage du gène MDR1 en utilisant des siARN afin de réduire l'expression de la protéine P-gp chez le cancer du sein, plus précisément, celles qui se sont concentrées sur la résistance des cellules MCF-7 MDR aux chimiodrogues; d'où l'importance de notre étude.

Dans ce projet de recherche, les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR ont été transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. Quatre séquences de siARN, anti-MDR1 (décrites dans la section 3.1) ont été testées. Chacun des siARN est composé de 21 acides nucléiques, dont deux dépassants à l'extrémité 3'. Les duplexes ARN_1 et ARN_2 sont formés exclusivement de désoxyribonucléotides alors que les siARN_1M et ARN_2M sont formés de ribonucléotides au niveau des extrémités dépassantes (overhangs) en 3'. Les quatre séquences ont été choisies suite à une revue de littérature. Hao Wu et al. (2003), Stege et al. (2004) et Milette-Gonzalez et al. (2005) ont trouvé que les siARN_1 et siARN_2 sont efficaces pour silençer le gène MDR1 dans le cas des cellules cancéreuses.[3-5] De plus, Strapps et al. (2010) ont étudié les deux nucléotides 3' des bouts dépassants du brin guide des siARN et ont prouvé que, comparés aux extrémités dépassantes (overhangs) qui contiennent des deoxyribonucléotides en 3' du brin guide du siARN, le silençage, *in vivo* et *in vitro*, est le même dans les deux cas, mais dure plus longtemps dans le cas des siARN avec les overhangs rUrU et rArG.[6] C'est pour cette raison que deux autres séquences de siARN (siARN_1M et siARN_2M) ont été ajoutées à l'étude afin d'élucider l'effet des ribonucléotides des extrémités dépassantes sur l'efficacité du silençage du

gène MDR1 par qPCR. Il est à noter que les extrémités dépassantes des siARN_1M, siARN_2 et siARN_2M sont complémentaires à la séquence cible du gène MDR1.

La transfection des cellules MCF-7 MDR avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN (1, 1M, 2 ou 2M) a permis de conclure ce qui suit.

Premièrement, on note une absence significative de changement dans l'expression du gène MDR1 dans le cas de la transfection avec du chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1 comparé au chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2. Vu que les deux siARN ciblent la même région de l'ARNm du gène MDR1 à 4 acides nucléiques près, l'effet sur l'ARNm est le même et ainsi un silençage de MDR1 a eu lieu avec la même efficacité.

Deuxièmement, on obtient un silençage significatif du gène MDR1 dans le cas des ribonucléotides comparé aux deoxyribonucéotides sur les overhangs pour les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M comparé au chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1 et chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M vs chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2 respectivement (65 vs 53 et 71 vs 44 %). Ces résultats sont en désaccord avec ce que Strapps et al. avaient reporté : ces derniers ont transfecté des cellules Hepa 1-6 avec des Apob-siARN ayant des extrémités dépassantes en 3' formées de désoxyribonucléotides ou de ribonucléotides. Leurs résultats indiquent aucune différences dans le niveau de silençage du gène Apob. Les mêmes résultats ont été observés avec DharmaFECT. Notons que Strapps et al. ont utilisé les LNP ("lipid nanoparticle" ou "nanoparticule lipidique") comme système de livraison et leurs observations ont été réalisées 24 et 120 heures après transfection. En effet, selon les conditions expérimentales de notre projet, on mesure la variation de l'expression du gène MDR1 après 48 heures de transfection avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN. Ainsi, on peut imaginer que dans le cas de Strapps et al., une durée de 24 heures n'était peut-être pas suffisante pour voir l'effet du silençage du gène ApoB.

Troisièmement, le meilleur silençage a été obtenu en utilisant les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M (71%). Ce résultat est en accord avec les travaux d'Alameh et al. (2012) et Jean M. et al. (2012) et confirme le pouvoir du chitosane à livrer le siARN dans la cellule. Alameh et al. (2012) ont obtenu un silençage de 80% du gène RecQL1 chez les cellules LS174T en utilisant les nanoparticules chitosane (92-10-5)/RecQL1-siARN.[375] Jean M. et al.

(2012) ont obtenu un silençage de 56% du gène DPP-IV chez les cellules HepG2 et Caco-2 en utilisant les nanoparticules à base de chitosane (92-10-5)/DPP-IV-siARN.[43]

Cette diminution dans l'expression du gène MDR1 confirme les résultats obtenus par microscopie confocale et prouve, encore une fois, que suite à une transfection avec les chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, le siARN est libéré dans le cytosol et agit sur l'ARNm cible du gène MDR1. Cette interaction aboutit à la dégradation de l'ARN cible et mène au silençage du gène MDR1. Le pourcentage de silençage du gène MDR1 (71%) obtenu est plus élevé que celui déjà obtenu par Hao et al. (65%) en 2003 et par Xiao et al. (60%) en 2008.[3, 390, 391] Sachant que Hao et al., ainsi que Xiao et al. n'ont pas utilisé de système de livraison (des MDR1-siARN nus ont été utilisés pour transfecter les cellules MCF-7/Adr dans le cas de l'étude menée par Hao et al.; des MDR1-ARNi nus ont été employés pour transfecter les cellules Ncl-H460 dans le cas de Xiao et al.), on peut supposer que l'emploi du chitosane et des extrémités dépassantes des siARN formées de ribonucléotides contribue à la différence observée.

Cependant, le taux de silençage obtenu dans ce projet est inférieur à celui que notre équipe avait trouvé (90%).[392] En fait, notre équipe de laboratoire a mené un projet de recherche *in vitro* consistant à évaluer l'efficacité des nanoparticules chitosane-siARN à silençer le gène MDR1 dans un modèle de cancer de sein (cellules MCF-7 et MCF-7 MDR) en utilisant les nanoparticules chitosane/MDR1-siARN cocktail.[392] Vu que les deux études ont été réalisées sur les mêmes lignées cellulaires, et avec les mêmes concentrations de siARN et de chitosane, trois hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette différence. Tout d'abord, on peut imaginer que la différence provient du fait que notre groupe avait utilisé un cocktail de siARN (siGENOME SMART Pool par Dharmacon), ce qui semble être plus avantageux que de transfecter les cellules avec une séquence de siARN. D'autre part, on peut croire que cette différence provient d'une meilleure efficacité d'une ou de plusieurs séquences de siARN contenues dans le cocktail, comparé aux séquences utilisées dans le présent projet. En fait, ces séquences seraient donc être plus accessibles au complexe RISC et d'induire ainsi un meilleur silençage. Finalement, le cocktail de siARN utilisé cible les régions (1405-1423), (1870-1888), (2035-2053) et (3966-3984), alors que les siARN utilisés dans ce projet ciblent des régions (577-595) et (583-601). On pourra ainsi imaginer qu'un meilleur silençage du gène MDR1 est obtenu en ciblant une plus grande région (1405-3984).

D'autres études menées sur différents types de cancers (de l'estomac, etc.) ont reporté jusqu'à 80% de silençage du gène MDR1 en utilisant les siARN spécifiques. [4, 393] Cependant, les conditions expérimentales sont différentes de celles utilisées dans ce projet de recherche : type de cellules (NIH-MDR-G185, EPG85-257RDB), modèle de cancer (estomac), et la concentration des siARN (20 nM, 50 nM, 200 nM).

Quatrièmement, l'utilisation des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN(1, 1M, 2 et 2M) n'a pas permis de réduire le niveau d'expression du gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR à un niveau semblable aux cellules MCF-7. Ceci est directement lié à l'efficacité de transfection qui, à son tour, dépend de plusieurs facteurs dont le DDA, Mn du chitosane, le rapport N:P, la concentration du sérum, etc. Cependant, il est important de noter qu'aucune étude, jusqu'à ce jour, n'a donné un silençage total du gène MDR1 dans le cas des cellules MCF-7 MDR en utilisant les nanoparticules chitosane/siARN.

5.7 Resensibilisation des cellules cancéreuses du sein à la Doxorubicine

En théorie, une cellule MCF-7 MDR dont l'expression de son gène MDR1 a été largement diminuée par l'emploi des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN (1, 2, 1M et 2M respectivement), doit présenter beaucoup moins de protéines P-gp et ainsi devrait voir sa concentration intracellulaire en doxorubicine augmenter suite à un traitement avec ce dernier.

Afin d'identifier le pouvoir des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN à sensibiliser les cellules cancéreuses du sein à la doxorubicine, les IC₅₀ de doxorubicine pour les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR ont dû être déterminées. IC₅₀ de doxorubicine est la concentration qui permet de tuer 50% des cellules. Les résultats du test alamar confirment que les cellules MCF-7 MDR sont résistantes à la doxorubicine. Pour les cellules MCF-7 et MCF-7 MDR (non transfectées), les IC₅₀ obtenues sont de 28.4 nM et 6.7 µM respectivement. Ces valeurs sont proches de celles décrites dans la littérature qui varient de 0.4 à 35 nM pour les MCF-7 et de 1.9 à 7µM pour les MCF-7 MDR. [177, 351, 352, 394] Le degré de résistance est évalué en termes d'indice de résistance (R), qui est calculé selon la relation: $R = \text{IC}_{50} \text{ des cellules résistantes} / \text{IC}_{50} \text{ des cellules sensibles}$. Par conséquent, les cellules MCF-7 MDR sont d'environ 236 fois plus résistantes à la doxorubicine que de la lignée cellulaire MCF-7 d'origine. Cette résistance est causée par la surexpression de la protéine P-gp chez les cellules MCF-7 MDR. Craig et al. (1987) ont prouvé que les cellules MCF-7 MDR étaient 200 fois plus résistants à la

doxorubicine que les cellules MCF-7 et expriment jusqu'à 60 fois plus le gène MDR1, codant pour la protéine P-gp.[395] Une autre explication est que le développement de la résistance à la doxorubicine chez les cellules MCF7 est accompagné de modifications morphologiques uniques.

Il a été remarqué que les cellules résistantes présentent plusieurs noyaux dans le cytoplasme. Ceci est causé par une fusion cellulaire augmentée entre les cellules sous stress continu. [396] Ce stress continu est dû à la présence de doxorubicine dans l'environnement cellulaire. [396] De plus, plusieurs grandes vésicules, remplies de doxorubicine, ont été observées dans le cytoplasme des cellules résistantes, surtout autour du noyau. Plusieurs explications ont été formulées afin d'expliquer cette observation. Chen et al. ont suggéré que les cellules accumulent le médicament dans ces vésicules pour éviter l'effet de l'empoisonnement de la doxorubicine sur l'ADN, et pour aider à la clairance extracellulaire de la drogue en dehors de la cellule.[397] En raison de la forte concentration des transporteurs MRP (transporteurs des molécules de doxorubicine inactivées par leur liaison au glutathion) qui a été observée dans les membranes de ces vésicules, Rajagopal et al. ont proposé que ces vésicules puissent jouer un rôle dans l'inactivation métabolique de la doxorubicine.[398]

Une fois que la IC50 déterminée, les cellules préalablement transfectées avec les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN ont été traitées avec la dose IC50 de doxorubicine déjà identifiée. En théorie, les cellules MCF-7 MDR transfectées avec les nanoparticules sont plus sensibles aux drogues car elles ont subi un silençage du gène MDR1 (codant pour la protéine P-gp) par les MDR1-siARN. Une mortalité supérieure à 50% devrait être obtenue si les cellules ont été suffisamment resensibilisées à la doxorubicine. Une inhibition complète du gène MDR1 devrait rendre les cellules MCF-7 MDR aussi sensible que les cellules MCF-7. Cette restauration de la sensibilité signifie une diminution drastique de la protéine membranaire P-gp et ainsi une augmentation de la concentration intracellulaire de doxorubicine dans les cellules MCF-7 MDR. Doxorubicine va donc interrompre la liaison de la topoisomérase II à l'ADN et entraîne des cassures au niveau de l'ADN. Ceci aboutira à la mort des cellules MCF-7 MDR suite à la création de radicaux libres. [158] [139-142][163-165]

Il a été démontré que le gène MDR1 (aussi nommé ABCB1), codant pour la protéine P-gp, est entre 24 et 60 fois plus exprimé chez les cellules MCF-7 résistantes à la doxorubicine que chez les cellules MCF-7.[193, 395] Une diminution d'expression du gène MDR1, codant la protéine P-gp, de 71%, a été observée en transfectant les cellules MCF-7 MDR par les

nanoparticules chitosane-MDR1 siARN_2M. Lors du traitement de ces cellules avec doxorubicine (6.7 μ M), 60% de mortalité cellulaire a été obtenu. Il est important de noter que la mortalité observée (~50%) des cellules MCF-7 MDR non-transfectées et traitées avec la doxorubicine ont été normalisées à 100%. Ainsi les pourcentages de mortalités sont relatifs aux cellules non-transfectées (**Figure 4.11**). Une mortalité de 100% n'a pas été obtenue pour deux raisons. Premièrement, étant donné qu'une diminution d'expression du gène MDR1 de 71% a été obtenue, on peut imaginer que 29% du gène MDR1 est toujours exprimé. Ce niveau d'expression du gène MDR1 est responsable de l'expression de la protéine P-gp à la surface cellulaire, expulsant ainsi la doxorubicine à l'extérieur de la cellule, permettant donc à cette dernière de survivre. Deuxièmement, il a été remarqué qu'ABCC2 (MRP2) et ABCC6 (MRP6), deux gènes de la famille ABCC codant pour les transporteurs MRP, sont surexprimés chez les cellules MCF-7 résistantes à la doxorubicine.[399] En plus des ABCC2 et ABCC6, des gènes comme les ABCG2 (codant pour la BCRP) et le MVP (codant pour le LRP) sont surexprimés dans les cellules résistantes à la doxorubicine. La présence d'autres protéines jouant un rôle dans la résistance des cellules à la doxorubicine, rend le travail plus compliqué, car les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, spécifiques uniquement au gène MDR1, ne sont pas suffisants pour entraîner une mortalité à 100% des cellules MCF-7 MDR. Afin de contourner ce problème, une transfection combinée avec différentes nanoparticules chitosane/siARN ciblant les gènes MDR1, ABCC2, ABCC6, ABCG2 et MVP serait intéressante à tester.

Il est à noter qu'afin de s'assurer que la mortalité obtenue n'est pas causée par un caractère toxique des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, un test de cytotoxicité a été réalisé. Aucune mortalité cellulaire n'était observée, confirmant la non-toxicité des nanoparticules. Il est à noter que la non-toxicité des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN est importante pour éviter l'ajout d'effets secondaires à la chimiothérapie.

Une autre alternative pour améliorer l'efficacité du silençage est en essayant d'améliorer l'efficacité de transfection. Ceci pourra être réalisé en tirant avantage du mécanisme d'internalisation des nanoparticules par le mécanisme de fixation à un ligand ("ligand-mediated uptake") pour favoriser le ciblage et l'internalisation. Des ligands comme le galactose, la transferrine, l'acide folique et le mannose peuvent être conjugués à la surface des nanoparticules afin d'augmenter la spécificité de la transfection à partir de l'endocytose par un récepteur propre au ligand se retrouvant sur la surface des nanoparticules. Le récepteur de la transferrine est

présent sur la surface cellulaire de la majorité des cellules eucaryotes. [400] L'acide folique est surexprimé à la surface de plusieurs cellules cancéreuses. [401]

En somme, notre projet de recherche consiste à transfecter des cellules cancéreuses du sein MCF-7 MDR avec des nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN afin de silencer le gène MDR1. Ce silençage resensibilise les cellules MCF-7 MDR à la doxorubicine. Le traitement avec doxorubicine permet ainsi de tuer les cellules MCF-7 MDR. Même si les siARN à bout dépassant rUrU et rArG semblent plus efficaces que les siARN à bout dépassant d'ADN (dTdT) pour réduire l'expression du gène MDR1, ça ne semble pas suffisant pour montrer une différence au niveau de la resensibilisation des cellules MCF-7 MDR à la doxorubicine. Ceci est dû à la difficulté de silencer totalement le gène MDR1; la possibilité de présence d'autres gènes qui sont surexprimés et qui jouent un rôle dans la résistance des cellules MCF-7 MDR à la doxorubicine; et la présence de mécanismes inconnus que la cellule utilise pour survivre à la chimiothérapie.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

La résistance des cellules tumorales aux divers agents cytotoxiques, "multidrug resistance" ou MDR, est une limitation majeure à la mise au point d'un traitement efficace contre le cancer.

La chimiothérapie est l'emploi de substances chimiques pour traiter diverses maladies. Parmi ces maladies, on note le cancer. Malheureusement, le développement d'une résistance par les cellules cancéreuses face aux substances chimiques employées, les chimiodrogues, compromet son efficacité.

Le phénotype MDR est le résultat d'un empêchement d'accumulation des chimiodrogues dans la cellule cancéreuse dû, entre autres, à la surexpression de la protéine P-gp, codée par le gène MDR1. Nombreuses sont les études étudiant les moyens pour inhiber l'expression du gène MDR1 pour ainsi essayer d'augmenter la concentration des chimiodrogues dans la cellule tumorale menant à sa mort. Malheureusement, les résultats obtenus étaient souvent décevants : aucune inhibition totale du gène MDR1 dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7 MDR n'a pu être obtenue. Parmi les méthodes employées, on note l'usage de l'ARN interférent. Les ARN interférents ayant une taille comprise entre 21 et 23 nucléotides sont nommés des siARN. Ces molécules double-brins sont utilisées pour un silençage post-transcriptionnel spécifique d'un gène en particulier.

Une méthode permettant de réduire la concentration membranaire de la protéine P-gp chez les cellules MCF-7 MDR est l'utilisation de séquences de siARN spécifique au gène MDR1 permettant de le silençer. Cependant, l'efficacité de ce silençage est définie par le pouvoir du siARN à se rendre à l'intérieur de la cellule. Pour cette raison, le chitosane, un biomatériau non-toxique et biocompatible a été utilisé comme système de livraison. Basé sur des publications et sur le travail de notre laboratoire, le chitosane sous la formulation 92-10-5 (DDA, MM, N:P) a été choisi dans ce projet pour sa grande efficacité. Il a ainsi été complexé avec 4 différentes séquences de siARN pour ainsi donner quatre différentes nanoparticules : chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_1M, chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2 et chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M, où M correspond aux extrémités dépassantes formées de ribonucléotides.

En réalisant ce projet de recherche, on a pu créer des nanoparticules ayant la bonne taille, forme, diamètre et charge, et donc capables de transfecter efficacement les cellules MCF-7 MDR afin de réduire l'expression du gène MDR1 codant pour la protéine P-gp. Après avoir prouvé la présence et l'intégrité de l'ARNm spécifique au gène MDR1 dans les cellules MCF-7 MDR, et après avoir identifié POLR2A comme le gène de référence, les cellules ont été transfectées avec les nanoparticules puis une qPCR a été réalisée. Le meilleur silençage du gène MDR1 (71%) a été obtenu en utilisant les nanoparticules chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN_2M et le pouvoir des siARN à silençer le gène MDR1 fut amélioré par l'usage des extrémités dépassantes contenant des ribonucléotides. Finalement, le traitement des cellules MCF-7 MDR, transfectées avec les nanoparticules chitosane-MDR1 siARN_2M, avec la dose IC50 de doxorubicine a donné 60% de mortalité. L'absence d'une mortalité complète peut être expliquée par le silençage partiel du gène MDR1 par les nanoparticules chitosane-MDR1 siARN_2M et par la surexpression des ABCC2 (MRP2) et ABCC6 (MRP6). ABCC2 et ABCC6 sont deux gènes de la famille ABCC codants pour les transporteurs MRP ainsi que ABCG2 (codant pour la BCRP) et le MVP (codant pour le LRP).

Pour conclure, la complexité du cancer rend sans doute la tâche de trouver un traitement efficace anticancéreux beaucoup plus difficile. Comme le gène MDR1, il existe d'autres gènes qui sont connus ou non, qui sont surexprimés et qui codent pour des protéines jouant un rôle dans la résistance des cellules aux chimiodrogues. Cependant, des projets de recherche comme celui-là, ceux qui ont déjà été faits, et ceux qui seront faits, sont nécessaires afin d'arriver à l'ultime traitement qui marquera la victoire contre les maladies cancéreuses. Il sera intéressant de réaliser un projet où on transfecte les cellules MCF-7 MDR avec du chitosane (92-10-5)/MDR1-siARN, chitosane (92-10-5)/ABCC2-siARN, chitosane (92-10-5)/ABCC6-siARN, chitosane (92-10-5)/ABCG2-siARN et chitosane (92-10-5)/MVP-siARN afin de voir la différence au niveau de la resensibilisation de ces cellules à la doxorubicine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cancer, C.S. *Vue d'ensemble des statistiques sur le cancer*. 2015 [cited 2015 05 Mai 2015]; Available from: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/cancer-statistics-at-a-glance/?region=qc>.
2. Santé, O.M.d.I. *Cancer*. 2015 [cited 2015; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>.
3. Hao Wu, W.N.H., Jin-Ming Yang, *Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells* Cancer Research, 2003. **63**: p. 1515-1519.
4. Alexandra Stege, A.P., Christiane Nieth, aHermann Lage, *Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference*. Cancer Gene Therapy, 2004. **11**: p. 699-706.
5. Milette-González KE, C.S., Muthukumaran N, Saglimbeni GN, Wu X, Yang J, Apolito K, Shih WJ, Hait WN, Rodríguez-Rodríguez L, *The CD44 Receptor Interacts with P-Glycoprotein to Promote Cell Migration and Invasion in Cancer*. Journal of cancer research, 2005. **65**: p. 6660-6667.
6. Walter R. Strapps, V.P., Gladys T. Muir, Julie Rice, Stacey Orsborn, Barry A. Polisky, Alan Sachs and Steven R. Bartz, *The siRNA sequence and guide strand overhangs are determinants of in vivo duration of silencing*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**(14): p. 4788-4797.
7. Society, C.C. *Canadian Cancer Statistics publication*. 2013.
8. J. Ferlay, H.-R.S., F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int. J. Cancer, 2010. **127**: p. 2893–2917.
9. William F. Anderson¹, K.C.C., Shine Chang¹ and Mark E. Sherman³, *Comparison of Age-Specific Incidence Rate Patterns for Different Histopathologic Types of Breast Carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers 2004. **13**: p. 1128-1135.
10. A.S. Levenson, C.V.J., *MCF-7: the first hormoneresponsive breast cancer cell line*. Cancer Res, (1997). **57**: p. 3071–3078.
11. R.A. Campbell, P.B.-N., N.M. Patel, and S.A. D. Constantinidou, H. Nakshatri, *Phosphatidylinositol/3-kinase/Akt-mediated activation of estrogen receptor α : a new model for anti-estrogen receptor resistance*. J. Biol. Chem, (2001). **276**: p. 9817–9824.
12. C.M. Spencer, D.F., *Paclitaxel, A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer*. Drugs, (1994). **48**: p. 794–847.
13. Ruddon, R.W., *Cancer Biology*. 2007 Oxford University Press. 530.
14. Doctissimo. *Les différents types de cancer*. 2012; Available from: http://www.doctissimo.fr/html/sante/mag_2001/mag0803/sa_4387_types_cancer.htm.

15. Society, A.C. *Breast Cancer*. 2015; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-chemotherapy>.
16. *Breast Cancer*. 2013; Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer/treatment>.
17. J. Coutts, J.A.P., R. Brown et W. N. Keith, *Expression of topoisomerase II alpha and beta in an adenocarcinoma cell line carrying amplified topoisomerase II alpha and retinoic acid receptor alpha genes*. Br J Cancer, 1993 **68**(4): p. 793–800.
18. Smith K, H.S., Greenall M, Carmichael J, Harris AL, *Topoisomerase II alpha co-amplification with erbB2 in human primary breast cancer and breast cancer cell lines: relationship to m-AMSA and mitoxantrone sensitivity*. oncogene, 1993 **8**(4): p. 933-938.
19. Masayuki Nakagawa, S.E., Dixon KH, Horton J, Kelley K, Morrow C, Cowan KH., *Reduced Intracellular Drug Accumulation in the Absence of P-Glycoprotein (mdr1) Overexpression in Mitoxantrone-resistant Human MCF-7 Breast Cancer Cells* CANCER RESEARCH, 1992. **52**: p. 6175-6181.
20. Philippe Gros, Croop J, Housman D., *Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins*. Cell, 1986. **47**(3): p. p371–380.
21. Muller C, L.G., Ling V., *P-glycoprotein stability is affected by serum deprivation and high cell density in multidrug-resistant cells*. J Cell Physiol., 1995 **163**(3): p. 538-44.
22. Batist G, T.A., Sinha BK, Katki AG, Myers CE et Cowan KH, *Overexpression of a novel anionic glutathione transferase in multidrug-resistant human breast cancer cells*. J Biol Chem., 1986 **261**(33): p. 15544-15549.
23. Batist G, B.B., Makuch R, Hamilton TC, Katki AG, Louie KG, Myers CE et Ozols RF, *Serial determinations of glutathione levels and glutathione-related enzyme activities in human tumor cells in vitro*. Biochem Pharmacol, 1986 **35**(13): p. 2257-2259.
24. Harris AL, H.D., *Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment*. Acta Oncol, 1992. **31**(2): p. 205-213.
25. Wahl AF, D.K., Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW et Galloway DA, *Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis*. Nat Med, 1996 **2**(1): p. 72-79.
26. Cabral F, A.I., et Gottesman MM., *Isolation of a taxol-resistant Chinese hamster ovary cell mutant that has an alteration in alpha-tubulin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p.:4388-4391.
27. B., S.M.e.H., *The colR4 and colR15 beta-tubulin mutations in Chlamydomonas reinhardtii confer altered sensitivities to microtubule inhibitors and herbicides by enhancing microtubule stability*. J Cell Biol, 1991 **113**(3): p. 605-614.
28. Amy S. Clark, K.W., Samantha Streicher et Phillip A. Dennis, *Constitutive and Inducible Akt Activity Promotes Resistance to Chemotherapy, Trastuzumab, or Tamoxifen in Breast Cancer Cells*. Mol Cancer Ther, 2002 **1**: p. 707.

29. Anand S, P.-L.S.e.V.A., *AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol*. Cancer Cell, 2003. **3**(1): p. 51-62.
30. S., B.A.e.H., *Identification of a novel Bcl-xL phosphorylation site regulating the sensitivity of taxol- or 2-methoxyestradiol-induced apoptosis*. FEBS Lett, 2003 **538**(1-3): p. 41-47.
31. Ferlini C, R.G., Mozzetti S, Distefano M, Filippetti F, Martinelli E, Ferrandina G, Gallo D, Ranelletti FO et Scambia G., *Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance*. Mol Pharmacol, 2003 **64**(1): p. 51-58.
32. Jostein Malmo, S.A., Vårum KM, Strand SP., *Nanoparticle Mediated P-Glycoprotein Silencing for Improved Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier: A siRNA-Chitosan Approach*. PLOS ONE, 2013. **8**(1): p. 1-8.
33. Kazuhiro Katayama , K.N., and Yoshikazu Sugimoto, *Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells*. New Journal of Science, 2014. **2014**: p. 1-10.
34. Shi R , P.H., Yuan X, Zhang X, Zhang Y, Fan D, Liu X, Xiong D., *Down-regulation of c-fos by shRNA sensitizes adriamycin-resistant MCF-7/ADR cells to chemotherapeutic agents via P-glycoprotein inhibition and apoptosis augmentation*. J Cell Biochem, 2013. **114**(8): p. 1890-1900.
35. Zhi Peng , X.Z., Wang Y, Liu P, Cai Y, Lu S, Feng W, Han ZC., *Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells*. Cancer Gene Therapy, 2004. **11**: p. 707-712.
36. Navarro, S.R., Biswas S, Essex S, Tros de Ilarduya C, Torchilin VP., *P-glycoprotein silencing with siRNA delivered by DOPE-modified PEI overcomes doxorubicin resistance in breast cancer cells*. Nanomedicine, 2012. **7**(1): p. 65-78.
37. Perez J, B.C., Rigal C, Anthony B, Rousseau R, Dutour A., *Anti-MDR1 siRNA restores chemosensitivity in chemoresistant breast carcinoma and osteosarcoma cell lines*. Anticancer Res., 2011. **31**(9): p. 2813-2820.
38. Mironova NL, P.N., Kaledin VI, Nikolin VP, Vlassov VV, Zenkova MA., *The siRNA targeted to mdr1b and mdr1a mRNAs in vivo sensitizes murine lymphosarcoma to chemotherapy*. BMC Cancer, 2010. **10**(204).
39. Yu-Kyoung Oh, T.G.P., *siRNA delivery systems for cancer treatment*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **61**: p. 850–862.
40. Uyechi LS, G.L., Thurston G, Szoka FC Jr., *Mechanism of lipoplex gene delivery in mouse lung: binding and internalization of fluorescent lipid and DNA components*. Gene Ther., 2001. **8**(11): p. 828-36.
41. L.T. Nguyen , A.K., Barichello JM, Ishida T, Kiwada H., *Complex formation with plasmid dna increases the cytotoxicity of cationic liposomes*. Biol. Pharm. Bull, 2007. **30**: p. 751–757.
42. M.C. Fillion, P.N., *Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells*. Biochim. Biophys. Acta, 1997. **1329**: p. 345–356.

43. Jean M., A.M., Buschmann MD, Merzouki A., *Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes*. Gene Ther. , 2011. **18**(8): p. 807-16.
44. Myriam Jean , A.M., De Jesus D, Thibault M, Lavertu M, Darras V, Nelea M, Buschmann MD, Merzouki A., *Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes*. Eur J Pharm Sci, 2012. **45**(1-2).
45. G. Crini, P.-M.B., Éric GUIBAL |, *Chitine et chitosane: Du biopolymère à l'application: Presses Universitaires de Franche-Comté*. 2009.
46. Lavertu, M., et al., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. Biomaterials, 2006. **27**(27): p. 4815-4824.
47. M Jean, S.F., Lavertu M, Méthot S, Bouhdoud L, Buschmann MD, Merzouki A., *Chitosan–plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies*. Gene Therapy, 2009. **16**: p. 1097-1110.
48. Lavertu M, M.S., Tran-Khanh N, Buschmann MD., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. Biomaterials, 2006. **27**(27): p. 4815-4824.
49. Jean, M., et al., *Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes*. Gene therapy, 2011. **18**(8): p. 807-816.
50. UK, C.R. *How many different types of cancer are there?* 17 April 2013 April 2013]; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/cancer-questions/how-many-different-types-of-cancer-are-there>.
51. Canada, S. *Le cancer au Canada : cancers du poumon, du côlon et du rectum, du sein et de la prostate*. 2013-05-13 [cited 2015 2015-08-12]; Available from: <http://www.statcan.gc.ca/pub/82-624-x/2011001/article/11596-fra.htm>.
52. Little, J.B., *Holland-Frei Cancer Medicine. 5th edition;* , ed. C.I. Radiation. 2000.
53. Douglas Hanahan, R.A.W., *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
54. Hanahan D, W.R., *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
55. Preetha Anand, A.B.K., Chitra Sundaram, Kuzhuvelil B. Harikumar, Sheeja T. Tharakan, Oiki S. Lai, Bokyung Sung, Bharat B. Aggarwal, *Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes*. Pharm. Res, 2008. **25**(9): p. 2097-2116.
56. DH, R., *Genome-wide association studies: how predictable is a person's cancer risk?* Expert Rev Anticancer Ther 2009. **9**(4): p. 389-392.
57. Anand P, K.A., Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*. Pharm. Res, 2008. **25**(9): p. 2097-2116.

58. CM, C., *Oncogenes and cancer*. N. Engl. J. Med, 2008. **358** (5): p. 502-511.
59. AG, K., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer, 2001 **1**(2): p. 157-162.
60. Suzuki A, d.l.P.J., Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW, *High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice*. Current Biology, 1998. **8**(21): p. 1169-1178.
61. Fabia, D.e. *Les gènes BRCA1 et BRCA2*. 2015 [cited 2015 03 Juillet]; Available from: <http://www.centredeomaladiesdusein.ca/%20cancer-du-sein/genetique/les-genes-brca1-et-brca2/index.html>.
62. Harvey Lodish, A.B., S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, James Darnell, *Molecular Cell Biology, 4th edition*. 2000, New York: W. H. Freeman.
63. von Lintig FC, D.A., Varki NM, Wallace AM, Casteel DE, Boss GR., *Ras activation in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat., 2000. **62**(1): p. 51-62.
64. Slamon DJ, C.G., Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science 1987. **235**(4785): p. 177-182.
65. van de Vijver MJ, P.J., Mooi WJ, Wisman P, Lomans J, Dalesio O, Nusse R, *Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer*. N Engl J Med, 1988. **319**(19): p. 1239-1245.
66. Cynthia Osborne, P.W.e.D.T., *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications*. The Oncologist, 2004. **9**(4): p. 361-377.
67. Kobayakov DS, A.A., Klimachev VV, Lazarev AF, Lushnikova EL, Nepomnyaschikh LM, *Non-small cell lung cancer: HER2 oncogene status*. Arkh Patol, 2015. **77**(2): p. 3-9.
68. Medical, N. *What are Proto-Oncogenes?* 2015 30 juin 2015]; Available from: <http://www.news-medical.net/health/What-are-Proto-Oncogenes.aspx>.
69. Baker SJ, F.E., Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*. Science, 1989. **244**: p. 217-221.
70. Nigro JM, B.S., Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, et al., *Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types*. Nature, 1989. **342**: p. 705-708.
71. Vogan K, B.M., Leclerc JM, Brisson L, Brossard J, Brodeur GM, Pelletier J, Gros P, *Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas*. Cancer Res, 1993. **53**: p. 5269-5273.
72. Prives C, H.P., *The p53 pathway*. J. Pathol, 1999. **187**: p. 112-126.

73. Lacroix M, T.R., Leclercq G, *p53 and breast cancer, an update*. Endocr. Relat. Cancer, 2006. **13**: p. 293-325.
74. Herskowitz, I., *Functional inactivation of genes by dominant negative mutations*. Nature, 1987. **329**: p. 219-222.
75. Herskowitz, I., *A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast*. Nature, 1989. **342**: p. 749-757.
76. DF, E., *How many more breast cancer predisposition genes are there?* . Breast Cancer Research 1999. **1**(1): p. 14-17.
77. Campeau PM, F.W., Tischkowitz MD, *ereditary breast cancer: New genetic developments, new therapeutic avenues*. Human Genetics 2008. **124**(1): p. 31-42.
78. Boffetta P1, H.M., *Alcohol and cancer*. The Lancet Oncology, 2006. **7**(2): p. 149-156.
79. Kushi LH, B.T., Doyle C, Bandera EV, McCullough M, McTiernan A, Gansler T, Andrews KS, Thun MJ *American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity*. CA Cancer J Clin, 2006. **5**: p. 254-281.
80. Domingo JL , N.M., *Carcinogenicity of consumption of red and processed meat: What about environmental contaminants?* Environ Res, 2015. **145**: p. 109-115.
81. Lippi G, M.C., Cervellin G, *Meat consumption and cancer risk: a critical review of published meta-analyses*. Crit Rev Oncol Hematol, 2015.
82. Rohrmann S, L.J., *Processed meat: the real villain?* Proc Nutr Soc. , 2015. **1**: p. 1-9.
83. JM., G.-D.e.C., *Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients. A systematic review*. . Drugs 2007. **67**: p. 1167-1198.
84. Buell JF, G.T., Woodle S, *Malignancy after transplantation*. Transplantation, 2005a. **80**(suppl 2): p. S254-S264.
85. Taylor DO, E.L., Aurora P, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Kucheryavaya AY, Hertz MI., *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult heart transplant report*. J Heart Lung Transplant, 2008. **27**: p. 943-956.
86. Grulich AE, v.L.M., Falster MO, Vajdic CM., *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet., 2007. **370**(9581): p. 59-67.
87. Helmut K. Seitz, G.P., Ulrich A. Simanowski, *Alcohol and Cancer*. Recent Developments in Alcoholism, 1998. **14**: p. 67*95.
88. Helmut K Seitz, G.P., Ulrich A Simanowski, *Alcohol and Cancer*. Alcoholism Clinical and Experimental Research, 2001. **25**: p. 137–143.
89. Seitz, H.K.e.a., *In Recent Developments in Alcoholism: The Consequences of Alcoholism*. Alcohol and Cancer Cell, ed. M. Galanter. 1998, New York, London: Plenum Press.
90. al., G.P.e., *Alcohol and Cancer*. Alcohol & Alcoholism, 2004. **39**(3): p. 155–165.

91. Masanori Shimizu, J.M.L., Mikihiro Tsutsumi, Charles S. Lieber, *Immunohistochemical localization of ethanol inducible cytochrome P4502E1 in rat alimentary tract*. Gastroenterology, 1990. **93**: p. 1044–1050.
92. Boffetta P, A.H., *Tobacco use and cancer causation: association by tumour type*. J. Intern. Med, 2002. **252**(3): p. 206-224.
93. Gallagher RP, L.T., Bajdik CD, Borugian M., *Ultraviolet radiation*. Chronic Dis Can., 2010. **29**(1): p. 51-68.
94. Narayanan DL, S.R., Fox JL, *Ultraviolet radiation and skin cancer*. International Journal of Dermatology, 2010. **49**(9): p. 978–986.
95. Saladi RN, P.A., *The causes of skin cancer: a comprehensive review*. Drugs of today, 1998. **41**(1): p. 37–53.
96. Society, A.C. *How is breast cancer diagnosed?* 06/10/2015 [cited 2015 11 Décembre]; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-diagnosis>.
97. Fagiolo, L. *CANCER : PRÉSENTATION GÉNÉRALE Le diagnostic ?* [cited 2015 08 Juillet]; Available from: <http://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/cancer-presentation-generale/diagnostic>.
98. Society, A.C. *Signs and symptoms of breast cancer*. 2015 10/09/2015 [cited 2015 15 Décembre]; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/moreinformation/breastcancerearlydetection/breast-cancer-early-detection-signs-symptoms-br-ca>.
99. WebMD. *Breast Cancer Health Center*. [cited 2015 15 Août]; Available from: <http://www.webmd.com/breast-cancer/guide/understanding-breast-cancer-symptoms>.
100. Michael O'Dell MD, M.S.M., Dr. Michael O'Dell, Dr. Michael Stubblefield, *Cancer Rehabilitation: Principles and Practice* 2009. 1120.
101. Zheng W, L.S., *Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk*. Nutr Cancer 2009. **61**(4): p. 437-446.
102. LR, F., *Meat and cancer*. Meat Sci. , 2010. **84**(2): p. 308-313.
103. A, H., *Diet and cancer*. Swiss medical weekly 2011. **141**.
104. Kushi LH, D.C., McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, Gapstur S, Patel AV, Andrews K, Gansler T, *American Cancer Society Guidelines on nutrition and physical activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 30-67.
105. Vera Levina, Y.S., Brian Nolen, Xiaoning Liu, Yuri Gordin, Melissa Lee, Anna Lokshin, Elieser Gorelik, *Chemotherapeutic drugs and human tumor cells cytokine network*. Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 2031-2040.
106. Institute, N.C. *Cancer Vaccines*. 2011 [cited 2015 01 Juillet]; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/vaccines-fact-sheet#r7>.
107. Lollini PL, F.C., Patrizia Nanni, Guido Forni, *Vaccines for tumour prevention*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(3): p. 204–216.

108. Institute, N.C. *FDA Approval for Sipuleucel-T*. 2013 [cited 2015 25 Avril]; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-sipuleucel-T>.
109. Philip W. Kantoff, M.D., Celestia S. Higano, M.D., Neal D. Shore, M.D., E. Roy Berger, M.D., Eric J. Small, M.D., David F. Penson, M.D., Charles H. Redfern, M.D., Anna C. Ferrari, M.D., Robert Dreicer, M.D., Robert B. Sims, M.D., Yi Xu, Ph.D., Mark W. Frohlich, M.D., and Paul F. Schellhammer, M.D, *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(5): p. 411–422.
110. cancer, S.C.d. *Vaccins anticancéreux*. Vaccins anticancéreux [cited 2015 12 Decembre]; Available from: http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/chemotherapy-and-other-drug-therapies/biological-therapy/cancer-vaccines/?region=qc#Vaccins_thérapeutiques.
111. Joura EA, L.S., Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J., *Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials*. Lancet, 2007. **369**(9574): p. 1693-1702.
112. Rivoltini L , C.P., Huber V, Iero M, Pilla L, Valenti R, Fais S, Lozupone F, Casati C, Castelli C, Parmiani G, *Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control?* Expert Opinion on Biological Therapy, 2005. **5**(4): p. 463–476.
113. Steven A Rosenberg, J.C.Y., Nicholas P Restifo, *Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*. Nature Medicine, 2004. **10**(9): p. 909–915.
114. BS, K., *The science of early detection*. Urol Oncol, 2004. **22**(4): p. 344-347.
115. Institute, N.C. *Cancer Screening Overview—for health professionals (PDQ®)*. 2015 [cited 2015 01 Juillet]; Available from: http://www.cancer.gov/about-cancer/screening/hp-screening-overview-pdq#cit/section_1.3.
116. Mobecomm. *Meik Device*. 2015 [cited 2015 16 décembre]; Available from: <http://mobecomm.com/meik-device.php>.
117. Khleif, R.T.S.a.S.N., *Handbook of Cancer Chemotherapy*, ed. L.W. Wilkins. 2011. 1.
118. Cheung-Ong K, G.G., Nislow C, *DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology*. Chem Biol, 2013. **20**(5): p. 648-659.
119. Lawrence TS, T.H.R., Giaccia A, *Principles of Radiation Oncology*, ed. L.T. DeVita VT Jr., Rosenberg SA. 2008, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
120. UK, C.R. *Radioactive iodine treatment for thyroid cancer*. 2014 [cited 2015 03 Mai]; Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/thyroid-cancer/treatment/radiotherapy/radioactive-iodine-treatment-for-thyroid-cancer>.

121. Rivkees, S.A., Sklar Charles, Freemark Michael *The Management of Graves' Disease in Children, with Special Emphasis on Radioiodine Treatment*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998. **83**(11): p. 3767-76.
122. Henriksen Gjermund, F.D.R., Roeske John C., Bruland Øyvind S., Larsen Roy H., *Targeting of Osseous Sites with α -Emitting ^{223}Ra : Comparison with the β -Emitter ^{89}Sr in Mice*. Journal of Nuclear Medicine, 2003. **44**(2): p. 252-9.
123. Institute, N.C. *Radiation Therapy for Cancer*. 2010 [cited 2015 01 Juillet]; Available from: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy/radiation-fact-sheet#r1>.
124. Society, C.C. *Effets secondaires de la radiothérapie*. 2015 [cited 2015 05 Septembre]; Available from: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/radiation-therapy/side-effects-of-radiation-therapy/?region=qc>.
125. Gopalan Soman, A.T.K., Dennis Michiel, Xiaoyi Yang, Nirmala Sapharishi, Hengguang Jiang, Steve Giardina, John Gilly, George Mitra, *Analytical characterization of ch14.18*. MAbs, 2012. **4**(1): p. 84-100.
126. Hortobagyi, G.N., *Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer*. The new england journal of medicine, 2005. **353**(16): p. 1734-1736.
127. Sunil Verma, D.M., Luca Gianni, Ian E Krop, Manfred Welslau, José Baselga, Mark Pegram, Do-Youn Oh, Véronique Diéras, Ellie Guardino, Liang Fang, Michael W Lu, Steven Olsen, Kim Blackwell, *Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer*. The New England Journal of Medicine 2012. **367**(19): p. 1783-1791.
128. Rosenberg, S.A., *Interleukin 2 for patients with renal cancer*. Nat Clin Pract Oncol., 2007. **4**(9): p. 497-498.
129. Roxanne Payne, G.L., Hoen H, Richards B, Smith JW, Lufkin R, Crocenzi TS, Urba WJ, Curti BD, *Durable responses and reversible toxicity of high-dose interleukin-2 treatment of melanoma and renal cancer in a Community Hospital Biotherapy Program*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2014. **2**(13).
130. Shan Wan, S.P., Ronald G. Jubin, Yi Lisa Lyu, Yu-Chen Tsai, Leroy F Liu, *Chemotherapeutics and Radiation Stimulate MHC Class I Expression through Elevated Interferon-beta Signaling in Breast Cancer Cells*. PLoS One, 2012. **7**(3).
131. Schiavoni G, M.F., Di Pucchio T, Santini SM, Bracci L, Belardelli F, Proietti E, *Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44^{hi} T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer*. Blood, 2000. **95**: p. 2024–2030.
132. Mokyr M, P.A., Artwohl JE, Valli VE, *Importance of signaling via the IFN- α/β receptor on host cells for the realization of the therapeutic benefits of cyclophosphamide for mice bearing a large MOPC-315 tumor*. Cancer Immunology, 2006. **55**: p. 459–468.
133. Harris CC, H.M., *Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene*. New Engl. J. Med., 1993. **329**: p. 1318-1327.

134. Fujiwara T, G.E., Mukhopadhyay T, Cai DW, Owen-Schaub LB, Roth JA, *A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis*. Cancer Res, 1993. **53**(18): p. 4129 – 4133.
135. Sorrentino BP, B.S., Bodine D, Gottesman M, Pastan I, Cline A, Nienhuis AW, *Selection of Drug-Resistant Bone Marrow Cells in Vivo After Retroviral Transfer of Human MDRI*. Science, 1992. **257**: p. 99-103.
136. Zhang JS , G.A., Cheville JC, Smith DI, Young CY., *AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **43**(3): p. 249-259.
137. Li S, H.S., Peng SB., *Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression*. Int J Oncol, 2005. **27**(3): p. 1329-1339.
138. Fung H, G.S., *Viral insertion site detection and analysis in cancer gene therapy*. Gene therapy for cancer, ed. L. EC. 2013, San Diego (CA): Elsevier. 35-46.
139. Montazami N, K.A.M., Majidi J, Yousefi M, Yousefi B, Mohamadnejad L, Shanebandi D, Estiar MA, Khaze V, Mansoori B, Baghbani E, Baradaran B., *siRNA-mediated silencing of MDRI reverses the resistance to oxaliplatin in SW480/OxR colon cancer cells*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2015 **61**(2): p. 98-103.
140. Wang Z, Z.H., Wang J, Yang Y, Wu Q, *RNA interference-mediated silencing of G protein-coupled receptor 137 inhibits human gastric cancer cell growth*. Mol Med Rep, 2015. **11**(4): p. 2578-84.
141. Vanderlaag KE1, H.S., Bald L, Fayadat-Dilman L, Sathe M, Grein J, Janatpour MJ, *Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor- α and survivin*. Breast Cancer Research, 2010. **12**(R32).
142. al., D.C.e., *Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future*. Clinical Medicine & Research, 2006. **4**(3): p. 218-227.
143. Therapy, A.S.o.G.C. *Cancer Gene Therapy and Cell Therapy*. 2015 [cited 2015 02 Juillet]; Available from: <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy-and-cell-therapy-for-diseases/cancer-gene-and-cell-therapy>.
144. Amer, M.H., *Gene therapy for cancer: present status and future perspective*. Molecular and Cellular Therapies, 2014. **2**(27).
145. Salva E , K.L., Eren F, Ozkan N, Cakalağaoğlu F, Akbuğa J, *Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer in vivo*. Nucleic Acid Ther., 2012. **22**(1): p. 40-8.
146. IH Abdulkareem, Z.I., *Review of hormonal treatment of breast cancer*. Nigerian Journal of Clinical Practice, 2012. **15**(1).
147. Fisher B, C.J., Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N., *Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study*. . J Nat Cancer Inst 1998. **90**: p. 137-1388.

148. Cole MP, J.C., Todd ID, *A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer: An early clinical appraisal of ICI46474*. Br J Cancer 1971. **25**: p. 270-275.
149. Kellie L Jones, A.U.B., *A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer*. Endocrine-Related Cancer, 2004. **11**: p. 367-406.
150. B.K. Sinha, E.G.M., S. Rajagopalan, C.E. Myers, *Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells: protective role of glutathione peroxidase in adriamycin resistance*. Cancer Res, 1989. **49**: p. 3844–3848.
151. G. Minotti, P.M., E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity*. Pharmacol. Rev., 2004. **56**: p. 185–229.
152. P. Tassone, P.T., A. Perricelli, S. Blotta, B. Quaresima, M.L. Martelli, A. Goel, V. Barbieri, F. Costanzo, C.R. Boland, S. Venuta, *BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells*. Br. J. Cancer, 2003. **88**: p. 1285–1291.
153. LF, L., *DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 351-375.
154. K. Villman, J.S., R. Heikkila, R. Hultborn, P. Malmstrom, N.O. Bengtsson, M. Soderberg, E. Saksela, C. Blomqvist, *TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer*. Acta Oncol, 2006. **45**: p. 590–596.
155. Wang, J.C., *DNA Topoisomerases*. Annual Review of Biochemistry, 1985. **54**: p. 665-697.
156. Wang, J.C., *Recent studies of DNA topoisomerases*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1987. **909**(1): p. 1-9.
157. S. de Jong, A.J.K., E.G. de Vries, N.H. Mulder, J.G. Zijlstra, *Topoisomerase II as a target of VM-26 and 4'-(9-acridinylamino) methanesulfon-m-aniside in atypical multidrug resistant human small cell lung carcinoma cells*. Cancer Res, 1993. **53**: p. 1064–1071.
158. KM Tewey, T.R., L Yang, BD Halligan, LF Liu, *ADRIAMYCIN-INDUCED DNA DAMAGE MEDIATED BY MAMMALIAN DNA TOPOISOMERASE II*. Science, 1984. **226**(4673): p. 466-468.
159. Thorn CF, O.C., Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB, *Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*. Pharmacogenet Genomics, 2011. **21**(7): p. 440–446.
160. Swift LP, R.A., Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM., *Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death*. Cancer Res, 2006. **66**: p. 4863-4871.
161. Richard Finkel, M.A.C., Luigi X. Cubeddu, *Pharmacology*, ed. R.A.H.e.P.C. Champe. 2009.
162. DA., G., *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**: p. 727–741.

163. BV, J., *Cardiotoxic consequences of anthracycline-containing therapy in patients with breast cancer*. Semin Oncol., 2006. **33**(3 Suppl 8): p. S15-21.
164. Injac R, S.B., *Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity*. Technol Cancer Res Treat, 2008. **7**(6): p. 497-516.
165. Ferreira AL, M.L., Matsubara BB, *Anthracycline-induced cardiotoxicity*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. , 2008. **6**(4): p. 278-281.
166. Guo B, V.D., Hembruff SL, Kirwan AF, Blais DE, Bonin M et Parissenti AM., *Cross-resistance studies of isogenic drug-resistant breast tumor cell lines support recent clinical evidence suggesting that sensitivity to paclitaxel may be strongly compromised by prior doxorubicin exposure*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **85**(1): p. 31-51.
167. Denard B, L.C., Ye J, *Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1*. eLife, 2012. **18**(1).
168. Patel AG, K.S., *How does doxorubicin work? A new mechanism involving cleavage of a transcription factor called CREB3L1 has been proposed to explain the anti-tumour effects of doxorubicin*. eLife, 2012. **1**.
169. Ehrke MJ, R.K., Cohen SA, *Cellular basis for adriamycin-induced augmentation of cell-mediated cytotoxicity in culture*. Cancer Res, 1984. **44**: p. 2497-2504.
170. Maccubbin DL, W.K., Mace KF, Ho RL, Ehrke MJ, Mihich E, *Adriamycin-induced modulation of host defenses in tumor-bearing mice*. Cancer Res, 1992. **52**: p. 3572-3576.
171. Kristin AD Sauter, L.J.W., John Wong, Mihail Iordanov, Bruce E Magun, *Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 β through activation of the NLRP3 inflammasome*. Cancer Biology & Therapy, 2011. **11**(12): p. 1008-1016.
172. R.V.T. Santos, C.E., de Mello MT, Rosa LF, *Effect of doxorubicin on cytokine production by lymphocytes and the Th1/Th2 balance*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2009. **64**(8): p. 579-581.
173. Abbas AK, S.A., *T-cell stimulation: an abundance of B7s*. Nat Med, 1999. **5**: p. 1345-1346.
174. Freeman GJ, L.A., Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T, *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**: p. 1027-1034.
175. Hazem Ghebeh, C.L., Eman Barhoush, Khaldoon Al-Romaih, Asma Tulbah, Monther Al-Alwan, SitiFaujiah Hendrayani, Pulicat Manogaran, Ayodele Alaiya, Taher Al-Tweigeri, Abdelilah Aboussekhra, Said Dermime, *Research article Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule*. Breast Cancer Research and Treatment, 2010. **12**(R48).
176. Hazem Ghebeh, C.L., Eman Barhoush, Khaldoon Al-Romaih, Asma Tulbah, Monther Al-Alwan, SitiFaujiah Hendrayani, Pulicat Manogaran, Ayodele Alaiya, Taher Al-Tweigeri, Abdelilah Aboussekhra et Said Dermime, *Research article Doxorubicin downregulates*

- cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule.* Breast Cancer Res 2010. **12**.
177. P Tassone, P.T., A Perricelli, S Blotta, B Quaresima, ML Martelli, A Goel, V Barbieri, F Costanzo, CR Boland et S Venuta, *BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells.* British Journal of Cancer, 2003. **88**: p. 1285 – 1291.
 178. J.R. Harris, M.E.L., M. Morrow, C.K. Osborne, *Treatment of metastatic breast cancer.* Diseases of the Breast (2nd ed.), ed. L.W. Wilkins. 2000.
 179. C.W. Taylor, W.S.D., P.R. Parrish, M.C. Gleason, W.T. Bellamy, F.H. Thompson, D.J. Roe, J.M. Trent, *Different mechanisms of decreased drug accumulation in doxorubicin and mitoxantrone resistant variants of the MCF7 human breast cancer cell line.* Br. J. Cancer, 1991. **63**: p. 923–929.
 180. T. Tsuruo, M.N., A. Tomida, N. Fujita, T. Mashima, H. Sakamoto, N. Haga, *Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signa.* Cancer Sci, 2003. **94**: p. 15–21.
 181. Leclercq, M.L.e.G., *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update.* Breast Cancer Research and Treatment, 2004. **83**: p. 249-289.
 182. Levenson AS, J.V., *MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line.* Cancer Research, 1997. **57**: p. 3071-3078.
 183. Lee AV, O.S., Davidson NE, *MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years.* JNCI J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(7).
 184. Soule HD, V.J., Long A, Albert S, Brennan M, *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.* J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1409-1416.
 185. Soule, H.V.J., Long A, Albert S, Brennan M., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.* Journal of the National Cancer Institute, 1973. **51**(5): p. 1409-1416.
 186. T. Tsuruo, M.N., A. Tomida, N. Fujita, T. Mashima, H. Sakamoto, N. Haga, *Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal.* Cancer Sci, 2003. **94**: p. 15–21.
 187. Kruh, G.D., *Introduction to resistance to anticancer agents.* Oncogene, 2003. **22**: p. 7262–7264.
 188. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance.* Annu. Rev. Med., 2002. **53**: p. 615–627.
 189. V.F. Chekhun, G.I.K., O.V. Yurchenko, V.P. Tryndyak, I.N. Todor, L.S. Luniv, N.A. TregubovaT, V. Pryzimirska, B. Montgomery, N.V. Rusetskaya, I.P. Pogribny, *Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells.* Cancer Lett., 2006. **231**: p. 87–93.
 190. M.M. Gottesman, T.F., S.E. Bates, *Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters* Nat. Rev. Cancer, 2002. **2**: p. 48–58.

191. D.J. Burgess, J.D., L. Zender, W. Xue, B. Ma, W.R. McCombie, G.J. Hannon, S.W. Lowe, M.T. Hemann, *Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS), 2008. **105**: p. 9053–9058.
192. J.M. Davis, P.M.N., C.R. Weinstein-Oppenheim, L.S. Steelman, W. Hu, M. Konopleva, M.V. Blagosklonny, J.A. McCubrey, *Raf-1 and Bcl-2 induce distinct and common pathways that contribute to breast cancer drug resistance*. Clin. Cancer Res., 2003. **9**: p. 1161–1170.
193. Shatha AbuHammad, M.Z., *Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line*. Genomics, 2012. **101**: p. 213–220.
194. V.Y. Chen, M.M.P., L. Zhao, G.R. Rosania, *Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer*. Oncogene, 2006. **25**: p. 1679–1691.
195. AA, S., *Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**: p. 95–106.
196. C. Teixeira, J.C.R., M.A. Pratt, *Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells*. Cancer Res, 1995. **55**: p. 3902–3907.
197. R.S. Jope, C.J.Y., E. Beurel, *Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics*. Neurochem. Res, 2007. **32**: p. 577–595.
198. Speelmans G, S.R., de Kruijff B, de Wolf FA, *Transport studies of doxorubicin in model membranes indicate a difference in passive diffusion across and binding at the outer and inner leaflets of the plasma membrane*. Biochemistry, 1994. **33**(46): p. 13761-8.
199. Skovsgaard T, N.N., *Membrane transport of anthracyclines*. Pharmacol Ther, 1992. **18**(3): p. 293-311.
200. Zhi Shi, P.X., Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, Bates SE, Shen T, Ashby CR Jr, Fu LW, Ambudkar SV, Chen ZS, *Erlotinib (Tarceva, OSI-774) Antagonizes ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 1 and ATP-Binding Cassette Subfamily G Member 2–Mediated Drug Resistance*. 67, 2007. **22**.
201. Xavier D, L.O., *Transport des anticancéreux par les transporteurs ABC et implications en hématologie*. Pharmacologie, 2009. **18**(2).
202. Suresh V Ambudkar, C.K.-S., Zuben E Sauna and Michael M Gottesman, *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. Oncogene, 2003. **22**: p. 7468-7485.
203. Aller SG, Y.J., Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G, *Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding*. Science, 2009. **323**.
204. Loo, T.W., M.C. Bartlett, and D.M. Clarke, *Identification of Residues in the Drug Translocation Pathway of the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein by Arginine Mutagenesis*. J Biol Chem, 2009. **284**.
205. AH, S., *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Semin. Cancer Biol, 1997. **8**: p. 161-170.

206. Johnson DR, F.R., Lin ZP, Zeiss CJ and Sartorelli AC, *The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance mdr1a/1b-and mrp1-deficient mice*. Cancer research, 2001. **61**(4): p. 1469-1476.
207. List AF, K.K., Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, Shurafa M, Appelbaum FR, *Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia : A Southwest Oncology Group study*. Blood, 2001. **98**(3212–3220).
208. Wolfgang Lo'scher, P.H., *Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family*. The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2005. **2**: p. 86-98.
209. SF, Z., *Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition*. Xenobiotica, 2008. **38**(7-8): p. 802-832.
210. Tip W. Loo, B.M., Clarke DM, *Identification of Residues in the Drug Translocation Pathway of the Human Multidrug Resistance P-glycoprotein by Arginine Mutagenesis*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24074-24087.
211. Maoqing Dong, L.L., Penin F, Deléage G, Baggetto LG, *Secondary structure of P-glycoprotein investigated by circular dichroism and amino acid sequence analysis*. Biochimica et Biophysica Acta, 1998. **1371**: p. 317-334.
212. JH, L., *Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**: p. 53-81.
213. Hoffmeyer S, B.O., von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U, *Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. . Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**: p. 3473-3478.
214. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR, *Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **70**: p. 189-199.
215. Ameyaw MM, R.F., Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA, McLeod HL, *MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity*. Pharmacogenetics, 2001. **11**: p. 217-221.
216. Ambudkar SV, K.-S.C., Sauna ZE, Gottesman MM, *P-glycoprotein: from genomics to mechanism*. Oncogene, 2003. **22**: p. 7468-7485.
217. Cascorbi I, G.T., John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I, *Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects*. Clin Pharmacol Ther, 2001. **69**: p. 169-174.
218. GJ, K.W.e.P., *Bacterial Multidrug resistance mediated by homologue of the human multidrug transporter P-glycoprotein*. IUBMB Life, 2002. **53**: p. 213-218.

219. Sayda M. Elbashir, J.H., Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber, Thomas Tuschl, *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-498.
220. Semizarov D, F.L., Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW., *Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 2003. **100**: p. 6347-6352.
221. Semizarov D, K.P., Fesik S, *siRNA-mediated gene silencing: a global genome view*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(13): p. 3836-3845.
222. Macino, C.C.e.G., *Conservation of transgene-induced post-transcriptional gene silencing in plants and fungi*. Trends Plant Sci, 1997. **2**: p. 438-443.
223. C. Cogoni, J.I., M. Schumacher, E. Selker and G. Macino, *Transgene silencing in vegetative cells of Neurospora crassa is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA: DNA interactions or DNA methylation*. 15, 1996. **3153-3163**.
224. Macino, N.R.e.G., *Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences*. Mol. Microbiol, 1992,. **6**(3343-3353).
225. Andrew Fire, S.X., Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver et Craig C. Mello, *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **39**(19): p. 806-811.
226. Mizuno T, C.M., Inouye M., *A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **81**(7): p. 1966-1970.
227. Andrew J Hamilton, D.C.B., *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science, 1999. **286**: p. 950-952.
228. Zamore PD, T.T., Sharp PA, Bartel DP, *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell, 2000. **31**(101): p. 25-33.
229. Gil J. et M. Esteban, *Induction of apoptosis by the dsRNA dependent protein kinase (PKR): mechanism of action*. Apoptosis. 5, 2000. **2**(107-114).
230. Paddison PJ, C.A., Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS., *Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*. Genes Dev. , 2002. **16**(8): p. 948-58.
231. Sui G, S.C., Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y, *A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5515-20.
232. Paul CP, G.P., Winer I, Engelke DR, *Effective expression of small interfering RNA in human cells*. Nat Biotechnol., 2002. **20**(5): p. 505-8.
233. Davis ME, Z.J., Choi CH, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A, *Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles*. . Nature, 2010. **464**(7291): p. 1067-70.

234. Sayda M. Elbashir, W.L., et Thomas Tuschl, *RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs*. GENES & DEVELOPMENT, 2001. **15**: p. 188-200.
235. Borkhardt, U.F.C.D.-W.e.A., *Silencing of Disease-related Genes by Small Interfering RNAs*. Current Molecular Medicine, 2004. **4**(5): p. 507-517.
236. Richard W. Carthew , S.E., *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2010. **136**(4): p. 642–655.
237. de Fougerolles A, V.H., Maraganore J, Lieberman J, *Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics*. Progress, 2007. **6**: p. 443-453.
238. Sontheimer, E.J., *ASSEMBLY AND FUNCTION OF RNA SILENCING COMPLEXES*. MOLECULAR CELL BIOLOGY, 2005. **6**: p. 127-138.
239. Tomari Y, Z.P., *Perspective: machines for RNAi*. Genes Dev, 2005. **19**: p. 517-529.
240. Orban TI, I.E., *Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome*. RNA, 2005. **11**: p. 459-469.
241. Shen B, G.H., *Uridine addition after microRNA-directed cleavage*. Science, 2004. **306**: p. 997.
242. Thomas E. Ichim, M.L., Hua Qian, Igor A. Popova,, Katarzyna Rycerz, Xiufen Zheng, David White, Robert Zhong et Wei-Ping Min, *RNA Interference: A Potent Tool for Gene-Specific Therapeutics*. American Journal of Transplantation, 2004. **4**: p. 1227–1236.
243. Amarzguioiui, M., Holen, T., Babaie, E, Prydz, H, *Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(589–595).
244. Chiu, Y.L.e.R., T.M, *siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis*. RNA, 2003. **9**(1034–1048).
245. Caplen NJ, M.S., *Short Interfering RNA (siRNA)—Mediated RNA Interference (RNAi) in Human Cells*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1002**: p. 56-62.
246. QIAGEN, P.-C.T.a.T. *Use of Enzymatically Generated and Chemically Synthesized siRNA*. Available from: <http://www.sabiosciences.com/newsletter/CSsirna.html>.
247. Chen, M.G., A.J.; Vanbrocklin, M.W.; Payne, W.S.; Hunt, H.; Zhang, H.; Dodgson, J.B.et Holmen, S.L., *Inhibition of avian leukosis virus replication by vector-based RNA interference*. Virology, 2007. **365**: p. 464-472.
248. Gao, S.D.-H., F.; Nielsen, E.J.; Wengel, J.; Besenbacher, F.; Howard, K.A. et Kjems, J., *The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice*. Mol. Ther., 2009. **17**: p. 1225-1233.
249. Wiltox MA, L.M., Wuisman PI, Curiel DT, Siegal GP, *Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: review*. Bone, 2007. **40**: p. 797-812.
250. Navarro J, R.R., Toschi M, Schattman G, *Gene Therapy and Intracytoplasmatic Sperm Injection (ICSI) – A Review*. Placenta, 2008. **29**: p. S193-S199.
251. S. Hacein-Bey-Abina, V.K.C., Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JJ,

- de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, *LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1*. Science, 2003. **302**(415): p. 415-419.
252. Gardlik R, P.R., Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P, *Vectors and delivery systems in gene therapy*. Med Sci Monit, 2005. **11**(RA110-RA121).
 253. Park TG, J.J., Kim SW, *Current status of polymeric gene delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2006. **58**: p. 467-486.
 254. Gardlik R, P.R., Hodosy J, Lukács J, Turna J, Celec P, *Vectors and delivery systems in gene therapy*. Med. Sci. Monit. , 2005. **11**(4): p. RA 110-121.
 255. Nancy Smyth Templeton , D.D.L., *New directions in liposome gene delivery*. Molecular Biotechnology, 1999. **11**: p. 175-180.
 256. Castanotto, D.e.R., J.J., *The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics*. Nature, 2009. **457**: p. 426-433.
 257. Gao, X.K., K.S. et Liu, D., *Nonviral gene delivery: what we know and what is next*. AAPS. J., 2007. **9**(E92-104).
 258. Giannoudis, P.V.T., C.C. et Tsiridis, E. , *Gene therapy in orthopaedics*. Injury, 2006. **37 Suppl 1**(S30-S40).
 259. Eisenberg E, L.E., *Human housekeeping genes, revisited*. Trends in Genetics, 2013. **29**(10): p. 569-574.
 260. Domènec Farré, N.B., Loris Mularoni, Xavier Messeguer et M Mar Albà, *Housekeeping genes tend to show reduced upstream sequence conservation*. Genome Biology 2007, 2007. **8**(R140).
 261. Eisenberg, E.e.L., E.Y, *Human housekeeping genes are compact*. Trends Genet., 2003. **19**: p. 362-365.
 262. Lawson, M.J.e.Z., L. , *Housekeeping and tissue-specific genes differ in simple sequence repeats in the 5'-UTR region*. Gene 2008. **407**: p. 54-62.
 263. T. Kean, M.T., *Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **62**: p. 3-11.
 264. Grégorio Crini, P.-M.B., Éric Guibal, *Chitine et Chitosane : du biopolymère à l'application*, ed. P.U. Franche-Comté. 2009. 303.
 265. Elsabee, M.Z., *Chitosan based edible films and coatings: A review*. Materials Science and Engineering, 2013. **33**(4): p. 1819-1841.
 266. Tianhong Dai, T.M., Huang YY, Hamblin MR, *Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011. **9**(7): p. 857-879.
 267. Mao J, Z.L., De Yao K, Shang Q, Yang G, Cao Y, *Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(2): p. 301-308.

268. Chao Yanga, L.X., Ying Zhoua, Xiangmei Zhang, Xin Huang, Min Wang, Ye Han, Maolin Zhai, Shicheng Wei, Jiuqiang Li, *A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing*. Carbohydrate Polymers, 2010. **82**(4): p. 1297-1305.
269. David P Clark, N.J.P., *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*. Biotechnology, ed. APCell. 2015. 850.
270. Marc Lavertu, M.S., Tran-Khanh N, Buschmann MD., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 4815-4824.
271. Michael D. Buschmann, A.M., Marc Lavertu, Marc Thibault, Myriam Jean, Vincent Darras, *Chitosans for delivery of nucleic acids*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(9): p. 1334-1270.
272. Alameh M, J.M., DeJesus D, Buschmann MD, Merzouki A., *Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing*. Int J Nanomedicine, 2010. **9**(5): p. 473-481.
273. Inmaculada Aranaz, M.M., Ruth Harris, Ines Panos, Beatriz Miralles, Niuris Acosta, Gemma Galed and Angeles Heras, *Functional characterization of chitin and chitosan*. Curr Chem Biol, 2009. **3**: p. 203-230.
274. S. Bagheri-Khoulenjani, S.M.T., H. Mirzadeh, *An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation*. Carbohydr Polym, 2009. **78**: p. 773-778.
275. M. Dasha. F Chiellini, R.M.O., E. Chiellinia, *Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Prog Polym Sci, 2011. **36**: p. 981-1014.
276. Godbey, W.T.W., K.K. et Mikos, A.G., *Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle*. J. Biomed. Mater. Res., 1999. **45**: p. 268-275.
277. Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N. et Buschmann, M.D., *High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 4815-4824.
278. Huang, M., Fong, C.W., Khor, E. et Lim, L.Y., *Transfection efficiency of chitosanvectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation*. J. Control Release, 2005. **106**: p. 391-406.
279. Liu, X., Howard, K.A., Dong, M., Andersen, M.O., Rahbek, U.L., Johnsen, M.G., Hansen, O.C., Besenbacher, F. et Kjems, J., *The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 1280-1288.
280. Qin Shi, M.J.T., Xiaoling Zhang, Kerong Dai, Mohamed Benderdour, Julio C. Fernandes, *Chitosan-DNA/siRNA Nanoparticles for Gene Therapy* Non-Viral Gene Therapy, ed. P.X. Yuan. 2011: InTech.
281. Katas, H., Chen, S., Osamuyimen, A.A., Cevher, E. et Oya, A.H., *Effect of preparative variables on small interfering RNA loaded Poly(D,L-lactide-co-glycolide)-chitosan*

- submicron particles prepared by emulsification diffusion method*. J. Microencapsul, 2008. **25**(541-548).
282. Katas, H.e.A., H.O., *Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery*. J. Control Release, 2006. **115**: p. 216-225.
 283. Rojanarata, T., Opanasopit, P., Techarpornkul, S., Ngawhirunpat, T. et Ruktanonchai, U, *Chitosan-thiamine pyrophosphate as a novel carrier for siRNA delivery*. Pharm. Res., 2008. **25**: p. 2807-2814.
 284. Bivas-Benita M, L.M., Versteyhe S, Dewit J, De Braekeleer J, Jongert E, Borchard G, *Generation of Toxoplasma gondii GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies*. Int. J. Pharm., 2003. **266**: p. 17-27.
 285. Chen J, Y.W., Li G, Qian J, Xue JL, Fu SK, Lu DR, *Transfection of mEpo gene to intestinal epithelium in vivo mediated by oral delivery of chitosan- DNA nanoparticles*. World J. Gastroenterol., 2004. **10**: p. 112-116.
 286. Khatri K, G.A., Gupta PN, Mishra N, Vyas SP, *Plasmid DNA loaded chitosan nanoparticles for nasal mucosal immunization against hepatitis B*. Int. J. Pharm. Res, 2008. **354**: p. 235-241.
 287. Yang PT, H.L., Jia WW, Skarsgard ED, *In Utero Gene Delivery Using Chitosan-DNA Nanoparticles in Mice*. J. Surg. Res., 2010. **171**(2): p. 691-699.
 288. E. Kai, T.O., *A method for oral DNA delivery with N-acetylated chitosan*. Pharm. Res, 2004. **21**(5): p. 838-843.
 289. R. Mandke, J.S., *Cationic nanomicelles for delivery of plasmids encoding interleukin-4 and interleukin-10 for prevention of autoimmune diabetes in mice*. Pharm Res, 2012. **29**(3): p. 883-897.
 290. E. Salva, L.K., F. Eren, N. Ozkan, F. Cakalagaoglu, J. Akbuga, *Local delivery of chitosan/VEGF siRNA nanoplexes reduces angiogenesis and growth of breast cancer in vivo*. Nucleic Acid Ther., 2012. **22**: p. 40-48.
 291. S.J. Lee, M.S.H., S.Y. Lee, S. Min, S. Lee, H. Koo, J.U. Chu, K.E. Lee, H. Jeon, Y. Choi, K. Choi, Y. Byun, S.Y. Jeong, K. Park, K. Kim, I.C. Kwon, *Tumor-Homing PolysRNA/Glycol Chitosan Self-Cross-Linked Nanoparticles for Systemic siRNA Delivery in Cancer Treatment*. Angew Chem Int Ed Engl, 2012. **51**: p. 7203-7207.
 292. H.S. Kim, H.D.H., G.N. Armaiz-Pena, R.L. Stone, E.J. Nam, J.W. Lee, M.M. Shahzad, A.M. Nick, S.J. Lee, J.W. Roh, M. Nishimura, L.S. Mangala, J. Bottsford-Miller, G.E. Gallick, G. Lopez-Berestein, A.K. Stood, *Functional roles of Src and Fgr in ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**: p. 1713-1721.
 293. H.D. Han, E.M.M., J.W. Roh, M. Nishimura, S.J. Lee, R.L. Stone, M. Bar-Eli, G. Lopez-Berestein, A.K. Sood, *Chitosan hydrogel for localized gene silencing*. Cancer Biology & Therapy, 2011. **11**: p. 839-845.
 294. Howard KA, P.S., Behlke MA, Besenbacher F, Deleuran B, Kjems J, *Chitosan/siRNA nanoparticle-mediated TNF-alpha knockdown in peritoneal macrophages for anti-inflammatory treatment in a murine arthritis model*. Mol. Ther., 2009. **17**: p. 162-168.

295. Andersen MO, H.K., Paludan SR, Besenbacher F, Kjems J, *Delivery of siRNA from lyophilized polymeric surfaces*. Biomaterials, 2008. **29**: p. 506-512.
296. Yu-Cheng Tseng, Subho Mozumdar, Leaf Huang, *Lipid-based systemic delivery of siRNA*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(9): p. 721-731.
297. Whitehead KA, L.R., Anderson DG, *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(2): p. 129-138.
298. Boeckle S, v.G.K., van der Piepen S, Culmsee C, Wagner E, Ogris M, *Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer*. J Gene Med, 2004. **6**(10): p. 1102-1111.
299. Casettari, L., *PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications*. Progress in Polymer Science, 2012. **37**(5): p. 659-685.
300. Wen Jen Lin, H.W., *Pegylation effect of chitosan based polyplex on DNA transfection*. Carbohydrate Polymers, 2014. **120**: p. 7-14.
301. Meenakshi Malhotra, L.C., Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Prakash S, *A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**: p. 485-494.
302. Jian Du, Y.-L.H., *PEGylation of chitosan for improved solubility and fiber formation via electrospinning*. Cellulose, 2007. **14**: p. 543-552.
303. Lü JM, W.X., Marin-Muller C, Wang H, Lin PH, Yao Q, Chen C., *Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. **9**(4): p. 325-341.
304. Betancourt T, B.J., Sunaryo N, Crowder SW, Kadapakkam M, Patel S, Casciato S, Brannon-Peppas L., *PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles*. J Biomed Mater Res A., 2009. **91**(1): p. 263-276.
305. G. Ioele, E.C., A. Risoli, G. Genchi, G. Ragno, *Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **293**(1-2): p. 251-260.
306. van Vlerken, D., Little, Seiden, Amiji, *Biodistribution and pharmacokinetic analysis of paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model*. Molecular Pharmaceutics, 2008. **5**: p. 516-526.
307. Dash M, C.F., Ottenbrite RM, Chiellini E, *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**: p. 981-1014.
308. Y.M. Yang, W.H., X.D. Wang, X.S. Gu, *The controlling biodegradation of chitosan fibers by n-acetylation in vitro and in vivo*. J. Mater. Sci. Mater. Med, 2007. **18**: p. 2117-2121.
309. J. Xu, S.P.M., R.A. Gross, D.L. Kaplan, *Chitosan film acylation and effects on biodegradability*. Macromolecules, 1996. **29**: p. 3436-3440.
310. S. Hirano, H.T., N. Nagao, *N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis*. Biomaterials, 1989. **10**: p. 574-576.

311. Tanima Banerjee , M.S., Kumar Singh A, Kumar Sharma R, Maitra A, *Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **243**(1-2): p. 93-105.
312. Gao S, D.-H.F., Nielsen EJ, Wengel J, Besenbacher F, Howard KA, Kjems J, *he effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice*. Mol Ther. , 2009. **17**: p. 1225-1233.
313. Emine Şalva, N.Ö., Levent Kabasakal, Suna Özbaş Turan, Jülide Akbuğa, *The Effect of Chitosan Complexes on Biodistribution of siRNA*. Journal of Marmara University Institute of Health Sciences 2011. **1**(1): p. 1-7.
314. S.W. Richardson, H.J.K., R. Duncan, *Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA*. International Journal of Pharmaceutics, 1999. **178**: p. 231-243.
315. H.Q. Mao, K.R., V.L. Troung-Le, K.A. Janes, K.Y. Lin, Y. Wang, J.T. August, K.W Leong, *Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency*. J Control Release, 2001. **70**: p. 399-421.
316. S. Gao, F.D.-H., E.J. Nielsen, J. Wengel, F. Besenbacher, K.A. Howard, J. Kjems, *The effect of chemical modification and nanoparticle formulation on stability and biodistribution of siRNA in mice*. Mol Ther., 2009. **17**: p. 1225-1233.
317. Torchilin, V., *Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**: p. 131-135.
318. Borja Ballarín-González, F.D.-H., Robert A Fenton, Shan Gao, San Hein, Mingdong Dong, Jørgen Kjems, Kenneth A Howard, *Protection and Systemic Translocation of siRNA Following Oral Administration of Chitosan/siRNA Nanoparticles*. Mol Ther Nucleic Acids, 2013. **2**(3): p. 1-8.
319. Howard, K.A., Rahbek, U.L., Liu, X., Damgaard, C.K., Glud, S.Z., Andersen, M., Hovgaard, M.B., Schmitz, A., Nyengaard, J.R., Besenbacher, F, Kjems, J, *RNA Interference in Vitro and in Vivo Using a Novel Chitosan/siRNA Nanoparticle System*. Molecular Therapy, 2006. **14**: p. 476-484.
320. L. Illum, I.J.-G., M. Hinchcliffe, A.N. Fisher, S.S. Davis, *Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **51**: p. 81-96.
321. Pathway, K., *Amino sugar and nucleotide sugar metabolism*. Kanehisa Laboratories, 2009.
322. Minoru Yabuki, A.U., Kuniko Suzuki, Akikazu Ando Takaaki Fujii, *Purification and properties of chitosanase from Bacillus circulans MH-K1*. J. Gen. Appl. Microbiol, 1988. **34**: p. 255-270
323. Shoji Okajima, A.A., Hirofumi Shinoyama, Takaaki Fujii, *Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by Amycolatopsis sp. CsO-2*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994. **77**(6): p. 617-620.
324. Shoji Okajima, T.K., Yuzuru Mikami, Akikazu Ando, *Purification and some properties of a chitosanase of Nocardioides sp.* The Journal of General and Applied Microbiology, 1995. **41**(4): p. 351-357.

325. J. Xu, S.P.M., R.A. Gross, D.L. Kaplan, *Chitosan film acylation and effects on biodegradability*. *Macromolecules* 1996. **29**: p. 3436-3440.
326. H. Onishi, Y.M., *Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice*. *Biomaterials*, 1999. **20**(175-182).
327. SB Rao, C.S., *Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential*. *J. Biomed. Mater. Res*, 1997. **34**(21-28).
328. H. Zhang, S.H.N., *In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents*. *Biomaterials*, 2002. **23**: p. 2761-2766.
329. G. Lu, B.S., G. Wang, Y. Wei, Y. Gong, X. Zhang, L. Zhang, *Controlling the degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan utilizing bimodal molecular weight distribution*. *J. Biomater. Appl.*, 2009. **23**(435-451).
330. K. Kafedjiiski, F.F., H. Hoyer, A. Bernkop-Schnurch, M. Werle, *Evaluation of in vitro enzymatic degradation of various thiomers and cross-linked thiomers*. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 2007. **33**: p. 199-208.
331. Chandra, S.N.e.R., *Theory, Techniques and Applications of Nanotechnology in Gene Silencing*. 2011: River Publisher. 193.
332. L. Ma, C.G., Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C. Han, *Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering*. *Biomaterials*, 2003. **24**: p. 4833-4841.
333. M. Ishihara, K.O., T. Ishizuka, M. Fujita, M. Sato, K. Masuoka, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Kikuchi, A. Kurita, *Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization*. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2003. **64**: p. 551-579.
334. Saito K, F.T., Yoshioka H, *Feasibility of simple chitosan sheet as drug delivery carrier*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006. **64**: p. 161-166
335. S. Hirano, M.I., K. Yamanaka, H. Tanaka, T. Toda, H. Inui, *Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbits*. *Agric. Biol. Chem*, 1991. **55**: p. 2623-2625.
336. Tabata, Y. and Y. Ikada, *Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo-and copolymers*. *Journal of biomedical materials research*, 1988. **22**(10): p. 837-858.
337. S. Hirano, H.S., Y. Akiyama, I. Nonaka, *Bio-compatibility of chitosan by oral and intravenous administrations, Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials: Science and Engineering*. American Chemical Society, 1988.
338. Borawski J, L.A., Buxton F, Labow M, Gaither LA, *Optimization Procedure for Small Interfering RNA Transfection in a 384-Well Format*. *Journal of Biomolecular Screening* 2007. **12**(4).
339. Scientific, T. *Thermo Scientific DharmaFECT -Transfection Reagents*. 2009 [cited 2015 12 Juillet]; Available from: https://www.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/br

- ochures-and-catalogs/brochures/thermo-scientific-dharmafect-transfection-reagents-brochure.pdf.
340. Vaubourdolle, M., *Infectiologie*. 2007, France: Wolters Kluwer. 1036.
 341. Biosystems, A. *Taq Man Gene Expression Master Mix*. 2007 [cited 2015 03 Mai]; Available from: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_039284.pdf.
 342. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
 343. Technologies, L. *Software Downloads-* 2015 [cited 2015 01 Juin]; Available from: <https://www.lifetechnologies.com/ca/en/home/technical-resources/software-downloads/expressionsuite-software.html>.
 344. Alameh M, J.M., DeJesus D, Buschmann MD, Merzouki A., *Chitosanase-based method for RNA isolation from cells transfected with chitosan/siRNA nanocomplexes for real-time RT-PCR in gene silencing*. Int J Nanomedicine, 2010. **5**.
 345. technologies, L. *ViiA™ 7 Real-Time PCR System*. 2015 [cited 2015 19 Juillet]; Available from: <http://www.lifetechnologies.com/ca/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/via-7-real-time-pcr-system.html>.
 346. Longo MC, B.M., Hartley JL, *Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions*. Gene, 1990. **93**: p. 125-128.
 347. Zahir, S.H.e.F., *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems -A Review (Part 2)*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2013. **12**(2): p. 265-273.
 348. *NANOCOMPOSIX'S GUIDE TO DYNAMIC LIGHT SCATTERING MEASUREMENT AND ANALYSIS*. Guidelines for Dynamic Light Scattering Measurement and Analysis 2015; Available from: https://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/nanoComposix_Guidelines_for_DLS_Measurements_and_Analysis.pdf.
 349. Hak Soo Choi, W.L., Preeti Misra, Eiichi Tanaka John P Zimmer, Binil Itty Ipe, Mouni G Bawendi & John V Frangioni, *Renal clearance of quantum dots*. NATURE BIOTECHNOLOGY, 2007. **25**(10).
 350. J Snoeys, L.J., Wisse E, Jacobs F, Duimel H, Collen D, Frederik P, De Geest B., *Species differences in transgene DNA uptake in hepatocytes after adenoviral transfer correlate with the size of endothelial fenestrae*. Gene Therapy, 2007. **14**(7): p. 604–612.
 351. Lawrence, J.-C.B., Vasilescu D, Mustafa A, Damian S, Damian Z, Georges E, Liu Z, Batist G, Leyland-Jones B., *Sensitization to doxorubicin resistance in breast cancer cell lines by tamoxifen and megestrol acetate*. Biochem Pharmacol, 1996. **52**(7): p. 1097–1102.
 352. Osman AM, B.H., Al-Harthi SE, Damanhour ZA, Elshal MF, *Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line*. Cancer cell International, 2012. **12**(47).
 353. Kirsty Jensen, A.J., Glass EJ, *Comparison of small interfering RNA (siRNA) delivery into bovine monocyte-derived macrophages by transfection and electroporation*. Vet Immunol Immunopathol., 2014. **158**(3-4): p. 224-232.

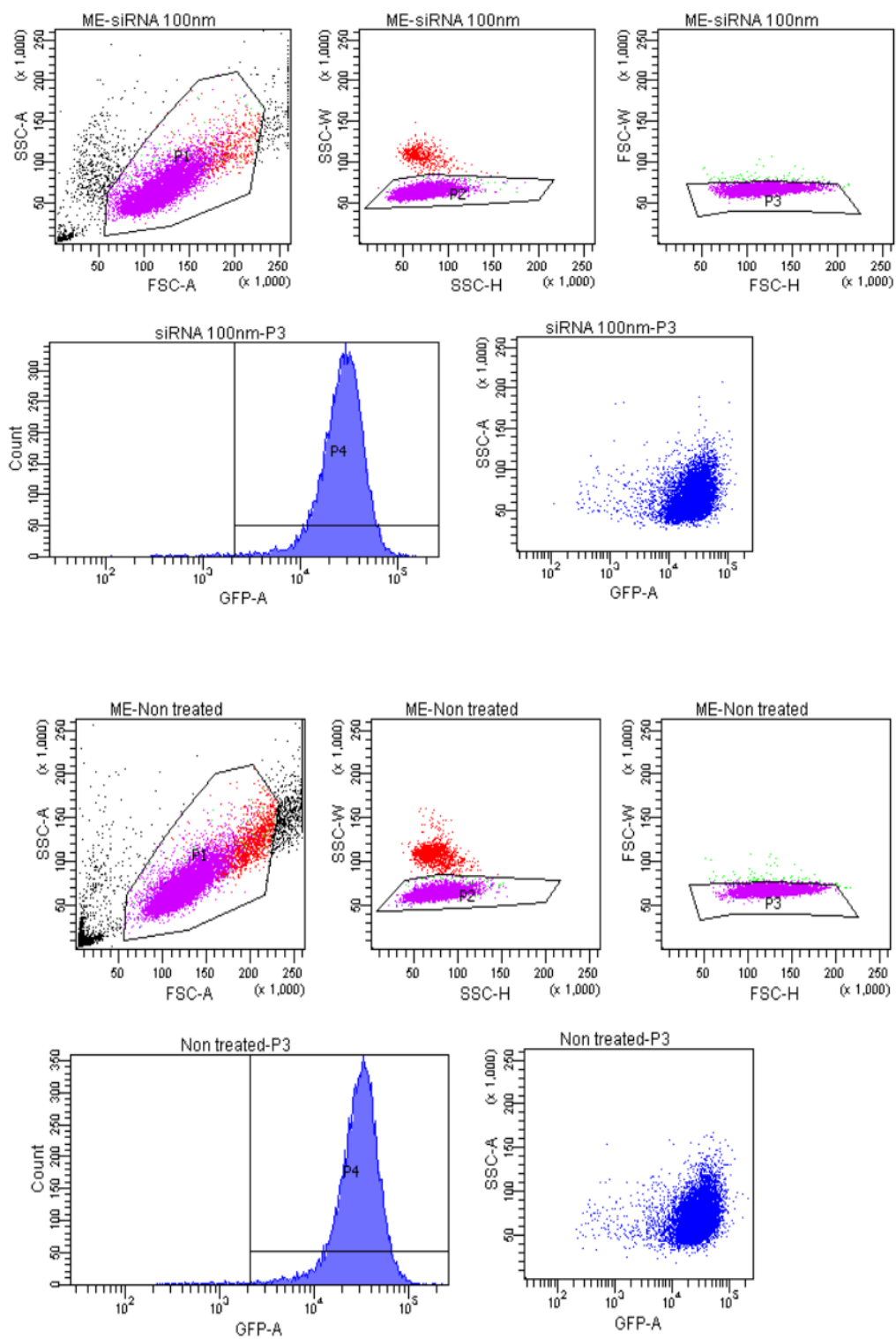
354. Roya Khosravi-Far, Z.Z., Richard A. Lockshin, Mauro Piacentini, *Programmed Cell Death, Part 2*. Vol. 446. 2008. 146.
355. Society, A.C. *What are the different types of cancer treatment?* 2015 [cited 2015 03/09/2015]; Available from: <http://www.cancer.org/treatment/understandingyourdiagnosis/talkingaboutcancer/whenso meoneyouknowhascancer/when-somebody-you-know-has-cancer-cancer-treatment-questions>.
356. Radia AM, Y.A., Ma X, Zhang J, Yang C, Dong Q, Rong P, Ye B, Liu S, Wang W., *Specific siRNA targeting receptor for advanced glycation end products (RAGE) decreases proliferation in human breast cancer cell lines*. Int J Mol Sci., 2013. **11**(4): p. 7959-78.
357. Raymond M. Schiffelers, A.A., Xu J, Zhou Q, Tang Q, Storm G, Molema G, Lu PY, Scaria PV, Woodle MC., *Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle*. Nucl. Acids Res, 2004. **32**(19).
358. Chad V. Pecot, G.A.C., Robert L. Coleman, Gabriel Lopez-Berestein and Anil K. Sood, *RNA interference in the clinic: challenges and future directions*. Nature Reviews Cancer, 2011. **11**: p. 59-67.
359. Premlata Shankar, N.M.a.J.L., *The Prospect of Silencing Disease Using RNA Interference*. JAMA, 2005. **293**: p. 1367-1373.
360. de Fougères A, V.H., Maraganore J and Lieberman J., *Interfering with disease: A progress report on siRNA-based therapeutics*. Nature Reviews: Drug Discovery, 2007. **6**: p. 443-453.
361. Priti Kumar, H.-S.B., Sang-Soo Kim, Haoquan Wu, Todd Pearson, Dale L. Greiner, Amale Laouar, Jiahong Yao, Viraga Haridas, Katsuyoshi Habiro, Yong-Guang Yang, Ji-Hoon Jeong, Kuen-Yong Lee, Yong-Hee Kim, Sung Wan Kim, Matthias Peipp, Georg H. Fey, N. Manjunath, Leonard D. Shultz, Sang-Kyung Lee, and Premlata Shankar, *T Cell-Specific siRNA Delivery Suppresses HIV-1 Infection in Humanized Mice*. Cell, 2008. **134**(577-586).
362. A Santel, M.A., O Keil, J Endruschat, V Esche, B Durieux, K Löffler, M Fechtner, T Röhl, G Fisch, S Dames, W Arnold, K Giese, A Klippel and J Kaufmann, *RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy*. Gene Therapy 2006. **13**: p. 1360-1370.
363. RH, P., *RNA SILENCING: THE GENOME'S IMMUNE SYSTEM*. Science, 2002. **296**: p. 1263-1265.
364. Wagner, D.S.e.E., *Gene therapy progress and prospects: synthetic polymer-based systems*. Gene Therapy, 2008. **15**: p. 1131-1138.
365. Muzzarelli, R.A.A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., Demarchis, M. et Paoletti, M.G., *Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial*. Carbohydrate Polymers, 2012. **87**: p. 995-1012.
366. Mao S, S.W., Kissel T, *Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2010. **62**: p. 12-27.

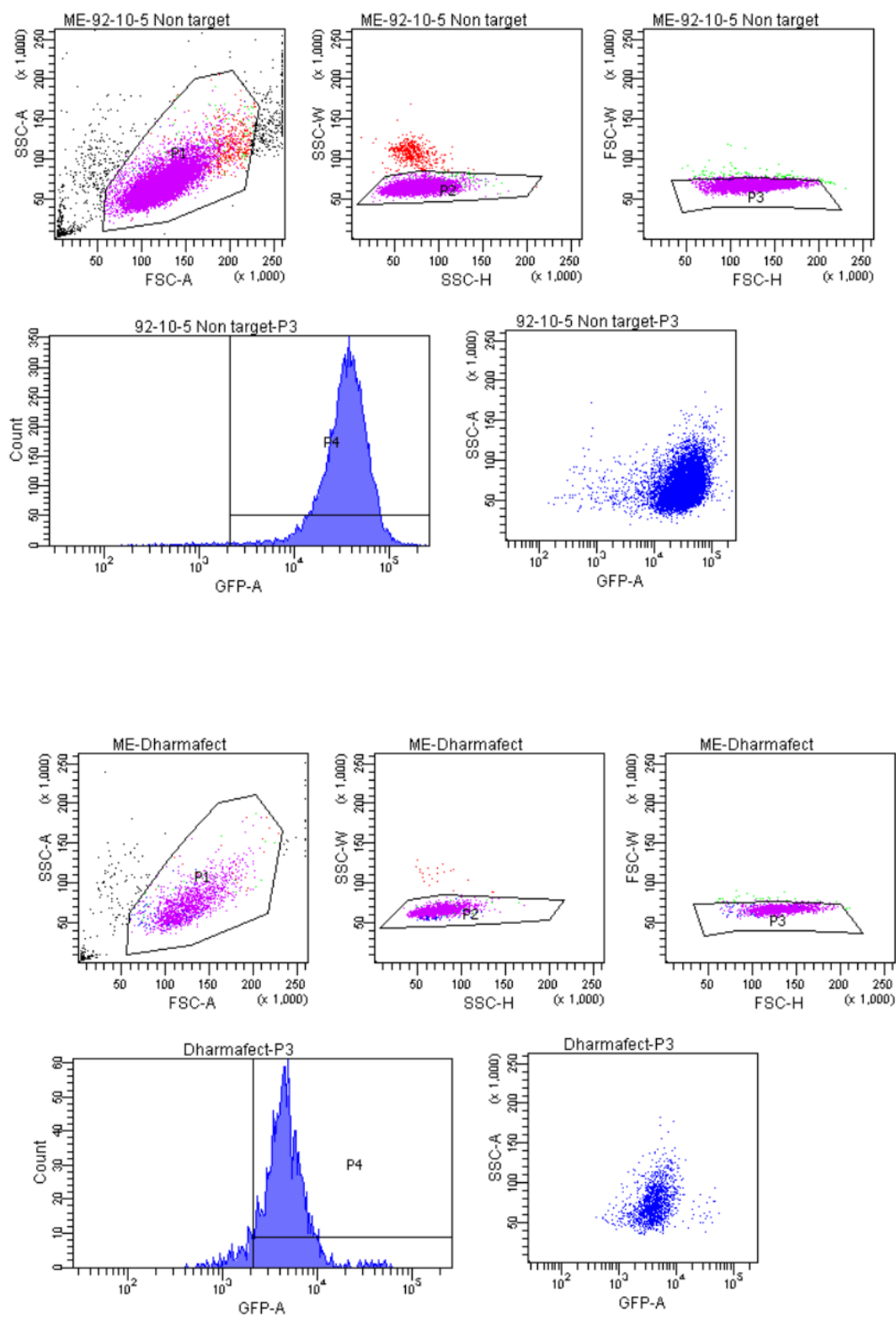
367. Jiehua Zhou, K.-T.S., John C. Burnett, John J. Rossi, *Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges* Pharmaceuticals 2013. **6**: p. 85-107.
368. G., B., *Chitosans for gene delivery*. Adv Drug Deliver Rev, 2001. **52**: p. 145-50.
369. Liu WG , D.Y.K., *Chitosan and its derivatives-a promising non-viral vector for gene transfection*. J Control Release 2002. **83**: p. 1-11.
370. Mansouri S, L.P., Corsi K, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC., *Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy*. Eur J Pharm Biopharm, 2004. **57**: p. 1-8.
371. Guy, J., Drabek D, Antoniou M., *Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy*. Molecular biotechnology, 1995. **3**(3): p. 237-248.
372. Seymour, L., *Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates*. . Critical reviews in therapeutic drug carrier systems,, 1991. **9**(2): p. 135-187.
373. Popielarski SR, H.-L.S., French SW, Triche TJ, Davis ME, *A Nanoparticle-Based Model Delivery System To Guide the Rational Design of Gene Delivery to the Liver*. Bioconjugate Chemistry, 2005. **16**(5).
374. Sato, T., Tsuyoshi Ishii, Yoshio Okahata, *In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency*. Biomaterials, 2001. **22**(15): p. 2075-2080.
375. Alameh, M., Dejesus D, Jean M, Darras V, Thibault M, Lavertu M, Buschmann MD, Merzouki A., *Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N: P ratio for nontoxic polynucleotide delivery*. International journal of nanomedicine, 2012. . **7**: p. 1399-414.
376. Strand, I.M., Christensen BE, Vårum KM, Artursson P., *Tailoring of chitosans for gene delivery: novel self-branched glycosylated chitosan oligomers with improved functional properties*. Biomacromolecules, 2008. **9**(11): p. 3268-3276.
377. M Thanou, J.C.V., H.E Junginger, *Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers*. . Adv Drug Deliver Rev 2001. **50**: p. S91-S101.
378. Carreno-Gomez B, R.D., *Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres*. . Int J Pharm 1997. **148**: p. 231-40.
379. Purwantiningsih Sugita, L.A., Farida Farichah, *INCREASING AMOUNT AND ENTRAPMENT EFFICIENCY OF CHITOSAN-KETOPROFEN NANOPARTICLE USING UTRASONICATION METHOD WITH VARIED TIME AND AMPLITUDE* IJRRAS 2013. **14**(3): p. 612-618.
380. Nurkhasanah, T.Y., Laela Hayu Nurani, Muhammad Ikhwan Rizki and Krisana Kraisintu, *THE DEVELOPMENT OF CHITOSAN NANOPARTICLES FROM HIBISCUS SABDARIFFA L CALYX EXTRACT FROM INDONESIA AND THAILAND*. IJRRAS, 2015. **IJPSR**(6): p. 5.
381. Esmaeilzadeh Gharehdaghi E, A.A., Khoshayand MR, Banan M, Esmaeilzadeh Gharehdaghi E, Amini MA, Faramarzi MA, *Chitosan nanoparticles for siRNA delivery:*

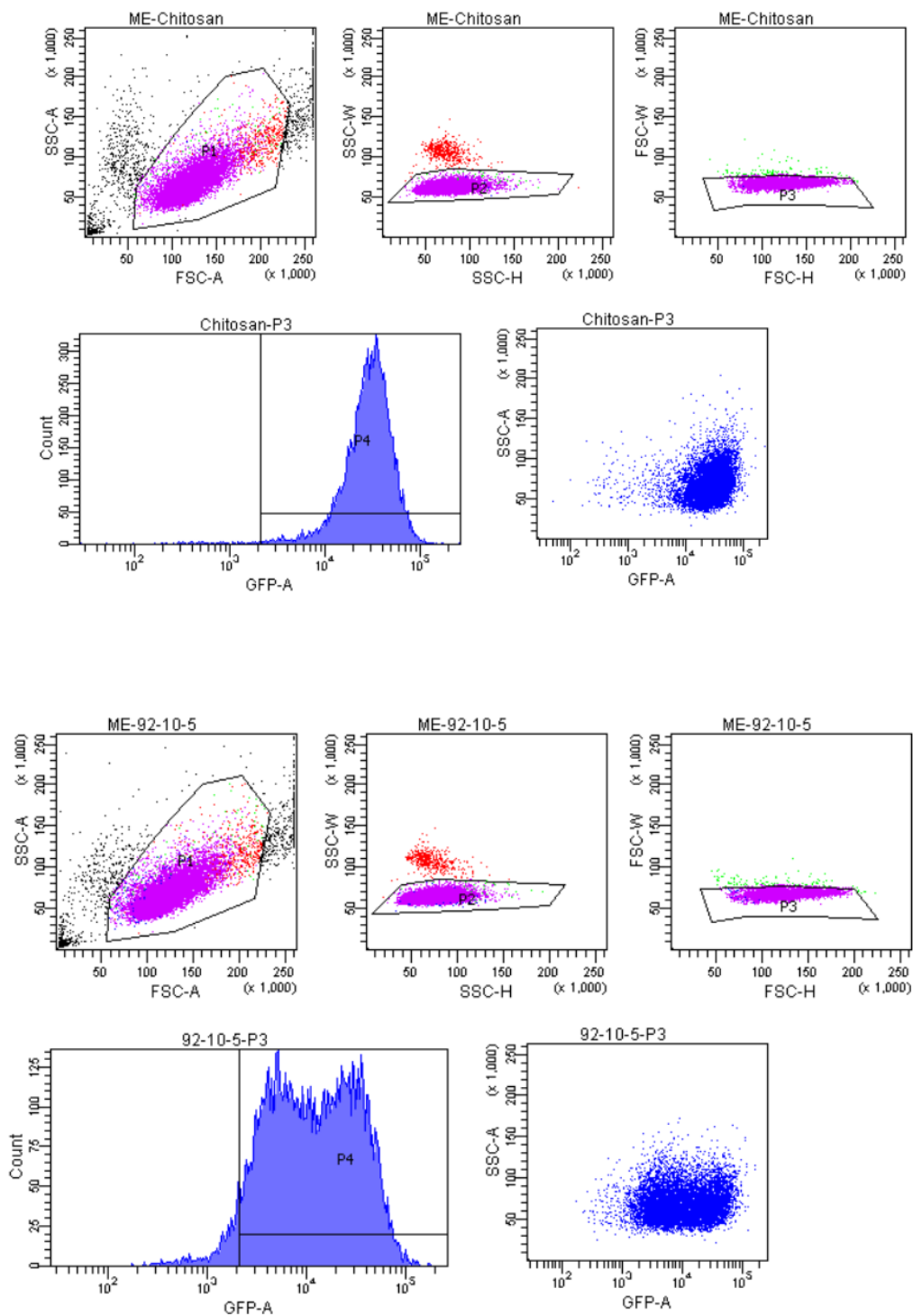
- optimization of processing/formulation parameters*. Nucleic Acid Ther. , 2014 **24**(6): p. 420-7.
382. Thibault M, A.M., Tran-Khanh N, Lavertu M, Darras V, Merzouki A, Buschmann MD, *Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes*. **Biomaterials**, 2011. **32**(20): p. 4639-46.
 383. Juliano R, B.J., Kang H, Ming X, *Biological barriers to therapy with antisense and siRNA oligonucleotides*. Mol Pharmacol, 2009. **6**(3): p. 686-695.
 384. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
 385. Bamias G, G.D., Laoudi E, Balla IG, Siakavellas SI, Daikos GL, Ladas SD, *Comparative study of candidate housekeeping genes for quantification of target gene messenger RNA expression by real-time PCR in patients with inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(13): p. 2840-7.
 386. Lin-Lin Liu, Z.H., Ma TF, Ge F, Chen CS, Zhang YP., *Identification of Valid Reference Genes for the Normalization of RT-qPCR Expression Studies in Human Breast Cancer Cell Lines Treated with and without Transient Transfection*. PLOS ONE, 2015. **10**(1): p. 1-15.
 387. Silvia Saviozzi, C.F., Lo Iacono M, Novello S, Scagliotti GV, Calogero RA., *Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 2006. **6**(200).
 388. Fahd Al-Mulla, A.M., Varadharaj G, Akhter N, Anim JT., *BRCA1 Gene Expression in Breast Cancer: A Correlative Study between Real-time RT-PCR and Immunohistochemistry*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2005. **53**(5): p. 621-629.
 389. Ian Faneyte, K.P., van de Vijver MJ., *Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer*. Int. J. Cancer, 2001. **93**: p. 114-122.
 390. Xiao H, W.Z., Shen H, Luo AL, Yang YF, Li XB, Zhu DY., *In vivo Reversal of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance by Efficient Delivery of StealthTM RNAi*. Basic & clinical pharmacology 2008. **103**(4): p. 342-348.
 391. Abbasi, M., A. Lavasanifar, H. Uludağ, *Recent attempts at RNAi-mediated P-glycoprotein downregulation for reversal of multidrug resistance in cancer*. Medicinal research reviews, 2013. **33**(1): p. 33-53.
 392. Mohamed, B., *Évaluation de l'efficacité des nanoparticules chitosane-siRNA à inhiber, in vitro, l'expression du gène MDR1 responsable de la résistance à la chimiothérapie*, in *Biomedical Engineering*. 2014, Université de Montréal: Montréal.
 393. Hao Stierlé V, L.A., Jollès B., *The reduction of P-glycoprotein expression by small interfering RNAs is improved in exponentially growing cells*. Oligonucleotides, 2004. **14**(3): p. 191-198.

394. Laura Smith, M.B.W., Sara L. O’Kane, Philip J. Drew, Michael J. Lind, Lynn Cawkwell, *The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(8): p. 2115-2120.
395. Fairchild CR, I.S., Kao-Shan CS, Whang-Peng J, Rosen N, Israel MA, Melera PW, Cowan KH, Goldsmith ME, *Isolation of Amplified and Overexpressed DNA Sequences from Adriamycin-resistant Human Breast Cancer Cells*. Cancer Res, 1987. **47**: p. 5141-5148.
396. J.Y. Yang, S.A.H., Y.S. Yang, J.W. Kim, *p-Glycoprotein ABCB5 and YB-1 expression plays a role in increased heterogeneity of breast cancer cells: correlations with cell fusion and doxorubicin resistance*. BioMed Central (BMC) Cancer, 2010. **10**.
397. V.Y. Chen, M.M.P., L. Zhao, G.R. Rosania, *Rapid doxorubicin efflux from the nucleus of drug-resistant cancer cells following extracellular drug clearance*. Pharm. Res., 2007. **24**: p. 2156–2167.
398. A Rajagopal, S.S., *Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins*. Mol. Biol. Cell, 2003. **14**: p. 3389–3399.
399. Shatha AbuHammad, M.Z., *Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line*. Genomics, 2013. **101**(4): p. 213–220.
400. A, D.-V., *Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor*. Biochimie, 1986. **68**: p. 375-381.
401. Lee, D., Lockey, R. et Mohapatra, S., *Folate receptor-mediated cancer cell specific gene delivery using folic acid-conjugated oligochitosans*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2006. **6**: p. 2860-2866.

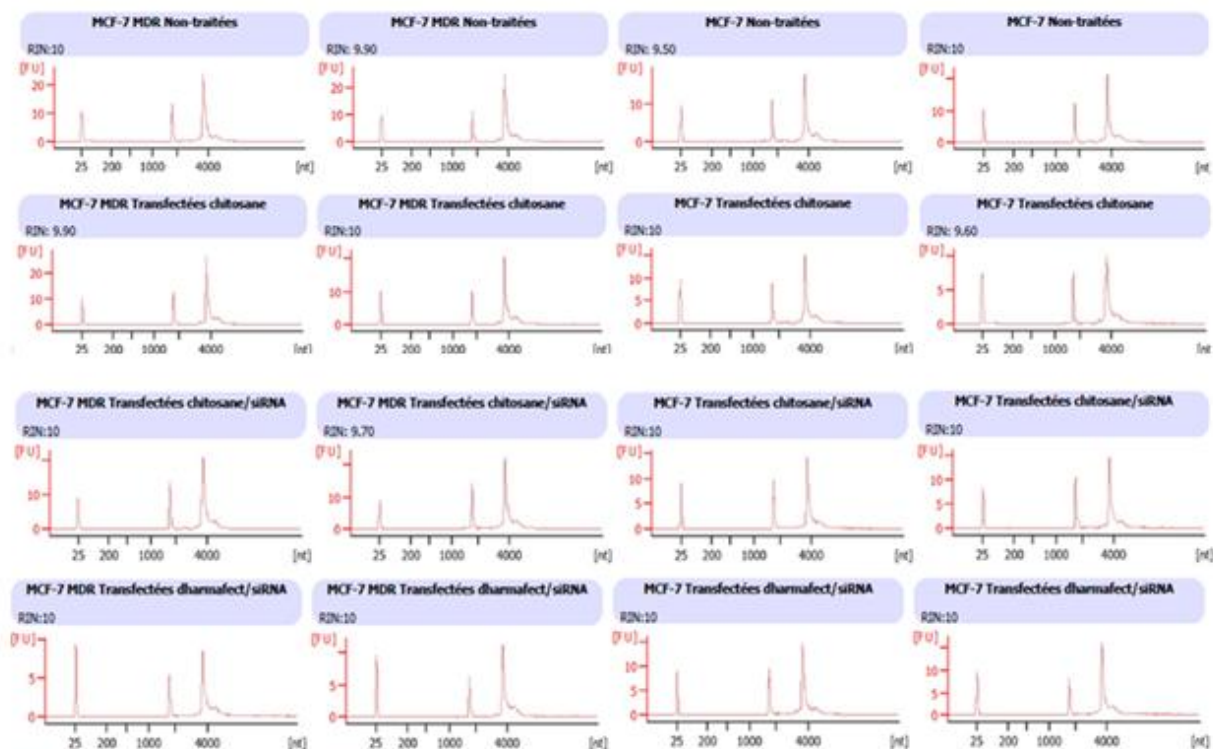
ANNEXE 1







Annexe 1. Résultats bruts de cytométrie en flux. Les cellules H1299 eGFP⁺ ont été transfectées avec le chitosane (92-10-5)/eGFP-siARN. La fluorescence des cellules a été détectée et présentée dans les figures.



Annexe 2. Bioanalyzer - Électrophérogrammes du Nombre d'intégrité de l'ARN total (RIN) extrait des cellules MCF-7 et MCF-7 MDR non-transfectées, traitées avec du chitosane (92-10) et transfectées avec des nanoparticules chitosane(92-10-5)/MDR1-siRNA_1 et des lipoplexes DharmaFect)/MDR1-siRNA_1